



T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ
HASTALARIN VE SAĞLIKLI VERİCİLERİN KEMİK
İLİKLERİNDEN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN LÖSEMİK BLASTLAR ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuba ÖZDEMİR

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2015

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ
HASTALARIN VE SAĞLIKLI VERİCİLERİN
KEMİK İLİKLERİNDEN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN LÖSEMİK BLASTLAR
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuba ÖZDEMİR

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara,
2015

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemili Hastaların ve Sağlıklı Vericilerin Kemik
İliklerinden Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Lösemik Blastlar Üzerindeki
Etkilerinin Karşılaştırılması

Tuba ÖZDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Tez Savunma Sınav Tarihi

07.09.2015

Danışman

Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÖNER

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÖNER

Prof. Dr. Fahri BAYIROĞLU

Doç. Dr. Sevil ÇAYLI

Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN

Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için
gerekli tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Özen ÖZİNSOY GÜLER

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gerekli tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmamın kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

07/09/2015

Tuba ÖZDEMİR



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezim için yaptığım tüm deneysel çalışmalar, Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kök Hücre İşleme ve Saklama Laboratuvarı ve Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmanın yönlendirilmesi ve yürütülmesi sırasında bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, değerli hocam Prof. Dr. Habibe Meltem ÖZGÜNER'e en derin minnet ve şükranlarımı sunmak isterim. Ayrıca, çalışmalarım boyunca katkı ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Sevil ÇAYLI'ya, değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Hilal GÖKTÜRK'e, Kanser Biyolojisi Yüksek Lisans programından hocalarım, Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER, Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN ve Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMSEK'e de sonsuz teşekkür ederim.

Kök Hücre İşleme ve Saklama Laboratuvarı'nda yürüttüğüm deneysel çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan ve özveriyle çalışan Biyolog Yasin KÖKSAL ve Laboratuvar Teknisyeni Elif CANAL'a, flow sitometri deneyleri için laboratuvarını bana açan ve deneyimlerini paylaştan Uzm. Dr. Fatma KARACA KARA'ya ve ekibinde yer alan Laboratuvar Teknisyeni Serap ÇAĞLA ve Emre ARSLAN'a teşekkür ederim.

Bu tezin her aşamasında yanımda olan, en zor zamanlarımda bir an olsun yalnız bırakmayan arkadaşlarıma bana göstermiş oldukları sabır ve sonsuz destek için çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, bütün eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, sevgi ve güvenlerini her zaman hissettiğim sevgili annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hematopoez.....	4
2.2. Çocukluk Çağı Lösemileri	6
2.2.1. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi	7
2.3. Kök Hücre ve Mezenkimal Kök Hücreler.....	11
2.4. Kemik İliği Mikroçevresi	16
2.4.1. Lösemide Kemik İliği Mikroçevresi	19
2.5. Apoptoz	21
2.5.1. Apoptoz Süreci ve Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler	21
2.5.2. Apoptozun Moleküler Düzenleyicileri	23
2.5.3. Apoptoz Sürecinin Hücre İçi ve Hücre Dışı Uyaranlarla Tetiklenmesine Göre Değerlendirilmesi	24
2.5.3.1. Ekstrinsik Yol (Reseptör Aracılı Apoptoz)	24
2.5.3.2. İntrinsik Yol (Mitokondri Aracılı Apoptoz)	26
2.5.4. Apoptoz Belirleme Yöntemleri	26
2.5.4.1. Annexin V/PI ile Apoptoz Tayini	27
2.5.5. Apoptoz ve Lösemi.....	28
2.6. Wnt Sinyal Yolağı	30

2.6.1. Wnt/ β -Katenin(Kanonik/Klasik) Yolağı	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM	34
3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi	34
3.1.1. Numunelerin Toplanması	34
3.2. Mononükleer Hücrelerin Ayrılması	34
3.2.1. Örneklerin Çözülmesi.....	35
3.3. Mononükleer Hücrelerden Blastik T Hücre İzolasyonu	36
3.3.1. İzole Edilen Blastik T Hücrelerin Flow Sitometrik Analizleri.	37
3.4. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Hücre Kültüründe Çoğaltılması 38	
3.4.1. Mononükleer Hücrelerden Mezenkimal Kök Hücre Kültürüne Geçiş	38
3.4.1.1.Mezenkimal Kök Hücre Kültüründe Pasajlamalar	39
3.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Blastlarla Kokültürü	40
3.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....	41
3.6.1. Morfolojik Analiz.....	41
3.6.2. Farklılaşma Testleri	41
3.7. Flow Sitometri ile Apoptoz Tayini.....	43
3.8. İmmünositokimya.....	46
3.9. İstatistiksel Analiz	48
4. BULGULAR	49
4.1.Çalışma Gruplarının Özellikleri	49
4.2. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre'lerin İzolasyonu, Üretilmesi ve Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular	50
4.2.1. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre'lerin İzolasyonu ve Çoğaltılması	50
4.2.2. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre'lerin Karakterizasyonu	50
4.3. Blastik T Hücrelerin Flow Sitometri ile Analizi	53

4.4. Flow Sitometri ile Apoptoz Tayinine İlişkin Bulgular	54
4.4.1. Hasta ve Sağlıklı Bireylerin Membranlı-Membransız Kokültürleri Sonrası Flow Sitometrik Analiz Bulguları	55
4.5. Flow Sitometri ile Apoptoz Tayini Sonucu Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizlerine İlişkin Bulgular	59
4.5.1. Faktör 1,2 ve 3' de ki Değerlerin Geç Apoptotik Hücreler Oranı Açısından Karşılaştırılması	59
4.5.2. Faktör 1,2 ve 3' de ki Değerlerin Erken Apoptotik Hücreler Oranı Açısından Karşılaştırılması	62
4.5.3. Faktör 1,2 ve 3' de ki Değerlerin Toplam Apoptotik Hücreler Oranı Açısından Karşılaştırılması	65
4.5.4. Faktör 1,2 ve 3' de ki Değerlerin Canlı Hücreler Oranı Açısından Karşılaştırılması	68
4.6. İmmunositokimya.....	71
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	79
7. KAYNAKLAR	81
8. EKLER	96
EK-1. Etik Kurul İzni	96
EK-2. Özgeçmiş	99
EK-3. Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar	100

ÖZET

Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemili Hastaların ve Sağlıklı Vericilerin Kemik İliklerinden Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Lösemik Blastlar Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

Akut lenfoblastik lösemi çocukluk çağında en sık görülen kanserdir. Kür oranı yüksek olmasına rağmen, çocuklarda önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. Kemik iliği mikroçevresi lösemi başlangıcında ve sürecinde önemli rol oynar. Mikroçevreyi oluşturan hücreler, özellikle mezenkimal kök hücreler (MKH), büyüme faktörleri, sitokinler ve hücre içi sinyaller üreterek ALL hücrenin sağkalımını, çoğalmasını ve ilaç direnci göstermesini düzenler. MKH'lerin lösemik hücre sağkalımına etkisi tam olarak bilinmemekle beraber salgılanan çeşitli sitokinler ya da blastlarla etkileşiminin etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda ALL'li ve sağlıklı bireylerin MKH'lerinin blastik hücreler üzerindeki apoptotik etkisi *in vitro* da hücre-hücre kontaklı olmadan (membranlı) ve hücre-hücre kontaklı sağlanarak (membransız) yapılan kokültür deneyleriyle incelenmiş ve blastik hücrelerin apoptotik özellikleri flow sitometri yöntemiyle analiz edilmiştir. Ayrıca MKH'ler de β -katenin proteininin ve apoptotik proteinler olan Bax, Bcl-2 ve Kaspaz 3'ün ekspresyon çalışmaları immunositokimyasal olarak belirlenmiştir.

Kokültür sonuçlarımıza göre hasta ve sağlıklı MKH'lerin blastlarla etkileşiminde apoptotik anlamda bir fark olmadığı ancak membranlı ve membransız olarak kokültüre edilen blast hücrelerinin apoptoz oranlarının değiştiği saptandı. MKH'lerde incelenen β -katenin, Bax, Bcl-2 ve Kaspaz 3 ekspresyonunun hasta-sağlıklı gruplarda ve membranlı-membransız gruplarda değiştiği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi, mezenkimal kök hücre, β -katenin

ABSTRACT

Comparison of Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow of Patients with Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Healthy Donors on Leukemic Blasts

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood. Despite the high rate of cure, ALL is one of the leading causes of death in children. The bone marrow microenvironment plays an important role in the initiation and progression of leukemia. Various components of this microenvironment, particularly MSCs, regulate ALL survival, proliferation, and drug resistance by producing growth factors, cytokines, and intracellular signals. The exact role of MSCs in leukemic cell survival is not well known, but probably they show their effects through secreting various cytokines or interact with the leukemic cells.

In our study, the apoptotic effects of MSCs of patients with childhood ALL and healthy donors on blastic cells were investigated *in vitro* by coculturing without cell-cell contact (with membrane) and providing cell-cell contact (without membrane). Apoptotic properties of blasts were analyzed by flow cytometry. The expression studies of β -catenin and Bax, Bcl-2 and Caspase 3 which are apoptotic proteins were determined as immunocytochemical methods in MSCs.

According to the result of coculture studies, when apoptotic rates of healthy-patients and with membrane, without membrane groups were compared, it was found out that there is no difference in the MSCs interaction with blasts of healthy donors and patients whereas it was seen that apoptosis rates of the blastic cells which were cocultured with and without membrane changed. In addition, it was noticed that β -catenin, Bcl-2, Bax and Caspase 3 expression of MSCs showed changes in patients and healthy donors as well.

Keywords: Apoptosis, Childhood acute lymphoblastic leukemia, mesenchymal stem cell, β -catenin

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AGM	: Aorta/Gonado/Mezonefroz
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Miyeloblastik Lösemi
Apaf	: Apoptoz proteaz aktive edici faktör
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
Bcl	: B hücreli lösemi
BFM	: Berlin-Frankfurt-Münih
BSA	: Sığır serum albumin
CAD	: Kaspazla aktiveleşen deoksiribonükleaz
CAF	: Karsinoma bağlantılı fibroblastlar
CD	: Cluster of Differentiation (Farklılaşma küme belirteçleri)
CLP	: Common Lymphoid Progenitors (Ortak Lenfoid Progenitörler)
CMP	: Common Myeloid Progenitors (Ortak Miyeloid Progenitörler)
CXCL	: c-x-c motif kemokin ligand
CXCR	: c-x-c motif kemokin reseptör
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine
DD	: Ölüm domaini
DED	: Ölüm efektör domaini
DMEM-LG	: Dulbecco's modified eagle medium low glukoz

DMSO	: Dimetil sülfoksit
DSKH	: Doku spesifik kök hücre
Dvl	: Dishevelled
EKH	: Embriyonik kök hücre
FADD	: Fas ilişkili ölüm domaini
FCM	: Flow sitometri
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FSC	: Önden saçılım
Fz	: Frizzled
GMP	: Granulocytic/Monocytic Precursor
GSK3 β	: Glikojen Sentez Kinaz 3 β
G-CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
G-CSFR	: Granülosit koloni uyarıcı faktör reseptörü
GVHD	: Graft Versus Host Hastalığı
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
HKH	: Hematopoetik kök hücre
HKHT	: Hematopoetik kök hücre transplantasyonu
HLA-DR	: İnsan lökosit antijen-DR
HLA-G	: İnsan lökosit antijen-G
IAP	: Apoptoz inhibitör proteini
ICAM	: Hücre içi hücre adezyon molekülü

IDO	: indoleamine 2,3- dioxygenase
IFN γ	: interferon gama
Ig	: İmmunglobulin
IL	: İnterlökin
IPKH	: İndüklenmiş pluripotent kök hücreler
ISCT	: Uluslararası Hücresel Terapi Topluluğu
Kİ	: Kemik iliği
KİT	: Kemik iliği nakil ünitesi
LFA	: Lenfosit fonksiyon-ilişkili antijen
LT-HKH	: Uzun süreli Hematopoetik Kök Hücre
MEP	: Megakaryocytic/Erythroid Precursor
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MKH	: Mezenkimal kök hücre
MOMP	: Mitokondri dışı membran geçirgenliği
MPP	: Multipotent progenitor
MRH	: Minimal rezidüel hastalık
PI	: Propidyum iyodür
PGE2	: Prostaglandin E2
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
SCF	: Kök hücre faktörü
SDF-1	: Stromal hücre kaynaklı faktör

SSC	: Yandan saçılım
ST-HKH	: Kısa Süreli Hematopoetik Kök Hücre
TAC	: Tetramerik antikor kompleksi
TCR	: T hücre reseptörü
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü beta
Th1	: Tip1 T yardımcı hücre
Th2	: Tip 2 T yardımcı hücre
TNF	: Tümör nekrozis faktörü
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VLA-4	: Very late antigen

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hematopoetik hiyerarşi modeli	6
Şekil 2.2. Lösemik hücrelerden tümör oluşumu	9
Şekil 2.3. Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri	13
Şekil 2.4. Vasküler ve endosteal niş	18
Şekil 2.5. Lösemik blastlar ve kemik iliği stromal hücreleri arasındaki etkileşimler	20
Şekil 2.6. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolağı	25
Şekil 2.7. Herbir yöntemin apoptoz sürecinde görev alan organellere göre dağılımı	27
Şekil 2.8. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının şematik gösterimi	32
Şekil 3.1. Mononükleer hücrelerin ayrışması ve dondurulması	35
Şekil 3.2. EasySep™ T Hücre izolasyonu kiti ve magnetiyle T hücre izolasyonu .	37
Şekil 3.3. Tetramerik antikor kompleksi	37
Şekil 3.4. Mononükleer hücrelerin T25'lik hücre flaskına ekimi, görüntülenmesi ve kültüre edilmesi	39
Şekil 3.5. Mezenkimal kök hücrelerin blastik hücrelerle kokültürü	40
Şekil 3.6. Mezenkimal kök hücrelerin morfolojik görünüşleri	41
Şekil 3.7. Mezenkimal kök hücrenin osteojenik farklılaşma aşamaları	42
Şekil 3.8. Flow sitometri cihazının şematik gösterimi	43
Şekil 3.9. Flow sitometri çalışmaları için kemik iliği ve periferik kandan kapılama stratejileri	44
Şekil 3.10. Flow sitometride apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi	45

Şekil 4.1. Adipojenik farklılaşma deneyine ait mikroskop görüntüleri	51
Şekil 4.2. Osteojenik farklılaşma deneyine ait mikroskop görüntüleri	52
Şekil 4.3. Mononükleer hücrelerden izole edilen blastik T hücrelerinin flow sitometrik analiz grafikleri	53
Şekil 4.4. T hücrelerin yüzey belirteçlerine göre flow sitometri ile analizi	54
Şekil 4.5. Annexin V-FITC/PI apoptoz kiti ile ALL'li hastaların blastlarının apoptoz oranlarının flow sitometrik olarak belirlenmesi.....	56
Şekil 4.6. Annexin V-FITC/PI apoptoz kiti ile ALL'li hastaların blastlarının apoptoz oranlarının flow sitometrik olarak belirlenmesi.....	58
Şekil 4.7. β -katenin immunositokimya çalışmasının DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojeni ile boyandıktan sonraki mikroskop görüntüleri.....	72
Şekil 4.8. MKH'lerde Bax'ın immunositokimyasal olarak boyanmış görüntüleri....	73
Şekil 4.9. MKH'lerde Kaspaz 3 ve Bcl-2'nin immunositokimyasal olarak boyanmış görüntüleri.....	74

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Çocukluk çağı lösemilerinde sınıflama.....	7
Tablo 2.2. MKH'ler tarafından üretilen immunmodulator moleküller.....	15
Tablo 3.1. Antikor-Konjuge Florokromların eksitasyon ve emilim değerleri	38
Tablo 4.1. Grup ve cinsiyete göre yaş değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler	49
Tablo 4.2. Belirtilen faktörlerde geç apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar.....	60
Tablo 4.3. Faktör 1 gruplarında diğer faktörlerde geç apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar	61
Tablo 4.4. Faktör 1 ile Faktör 2 gruplarında Faktör 3 geç apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar.	62
Tablo 4.5. Belirtilen faktörlerde erken apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar	63
Tablo 4.6. Faktör 1 gruplarında diğer faktörlerde erken apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar.	64
Tablo 4.7. Faktör 1 ile Faktör 2 gruplarında Faktör 3 erken apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar.	65
Tablo 4.8. Belirtilen faktörlerde toplam apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar.	66
Tablo 4.9. Faktör 1 gruplarında diğer faktörlerde toplam apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar.	67
Tablo 4.10. Faktör 1 ile Faktör 2 gruplarında Faktör 3 toplam apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar.	68
Tablo 4.11. Belirtilen faktörlerde canlı hücre oranlarına ait sonuçlar.....	69
Tablo 4.12. Faktör 1 gruplarında diğer faktörlerde canlı hücre oranlarına ait sonuçlar.	70
Tablo 4.13. Faktör 1 ile Faktör 2 gruplarında Faktör 3 canlı hücre oranlarına ait sonuçlar.	71

GİRİŞ

Birçok gelişmiş ülkede çocuklarda en yaygın ikinci ölüm sebebi olan kanser, ülkemizde de ilk sıralarda yer almaktadır (1). Kemik iliği kökenli hematopoez sırasında B ve T lenfosit olması yönünde uyarılan lenfoid progenitör hücrelerin malign dönüşümü sonucu oluşan Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), daha çok çocukluk çağında görülen oldukça agresif, malign hematolojik bir hastalıktır (2,3). Son yıllarda ALL ile ilgili bilgilerin artması ve geliştirilen yeni terapilerin ortaya çıkması oldukça önemli olmuştur. Buna rağmen önemli sayıda ALL hastası ya relapstan ya da tedaviye direnç göstererek hayatını kaybetmektedir (4).

Organizmanın en zengin kök hücre kaynağı olan kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, mezenkimal kök/stromal ve endotelial hücreler bulunmaktadır. Stromal kökenli olan mezenkimal kök hücreler (MKH), hematopoetik kök hücrenin (HKH) stromaya tutunmasında, çeşitli sitokinlerin salınımı ile hematopoetik öncü hücrenin olgun hücreye farklılaşmasında veya bazı sitokinlerin inhibisyonu ile kök hücrenin siklusun G0 fazında kalarak kök hücre rezervi oluşturmasında, kendini yenilemesi ya da gerektiğinde diğer dokulara mobilizasyonu gibi önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir (5). Hematopoetik kök hücreler ile kemik iliği mikroçevresinde yer alan stromal hücreler arasındaki etkileşimlerin ve değişimlerin lösemi gelişiminde veya seyrinde rol oynadığı ileri sürülmektedir (6).

Kemik iliği mikroçevresi lösemnin başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynar. Temel görevinin hematopoezin devamını sağlamak olduğu bilinen MKH'lerin, lösemi gibi primer kemik iliğinden kaynaklanan ve metastatik kemik iliği kanserlerinde de kanser hücreleri için kemoatraktan faktörler salgılayarak kanser hücrelerinin çoğalması için uygun mikroçevreyi sağladığı düşünülmektedir. Mikroçevrede yer alan MKH'lerin ALL hücrelerinin sağkalımlarını, çoğalmalarını

düzenlediği, o hücrelerle kontakt kurarak ya da çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler salgılayarak etki gösterdiği düşünölmektedir (6).

Hematopoetik prekürsörlerde matürasyonun duraklaması ve blastların hızlı proliferasyonu, programlı hücre ölümlü olan apoptoz yapabilme özelliğinin azalmasıyla sonuçlanır. Apoptoz özellikle hematopoetik sistemde hücrelerin homeostazında anahtar rol oynayan iyi düzenlenmiş, kontrollü hücreölüm programıdır. Karsinogenezdeki yeni elde edilen bilgiler lösemilerde apoptoz inhibisyonun, en az kontrolsüz hücre proliferasyonu kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur (7). Apoptotik yollaklarda veya çeşitli sinyal yollaklarında değişimler devreye girdiğinde lenfoblast diferansiye olma özelliğini kaybetmekte ve sınırsız çoğalma özelliği kazanmaktadır (8).

Embriyogenez ve doku homeostazının sürdürölmesi için gerekli proliferasyon, farklılaşma, sağkalım ve anjiyogenez gibi hücreöl süreçlerin düzenlenmesinde önemli olan Wnt sinyal yolağı, son yıllarda üzerinde durulan oldukça ilgi çekici bir yollaktır. Temel olarak 3 farklı Wnt sinyal yolağı tanımlanmıştır ve bunlardan kanser gelişiminde rol oynayan tipi Wnt/ β -katenin yolağıdır. Bu yolağın anlaşılmasında merkezi rolü β -katenin oynar. Wnt sinyali yokluğunda β -kateninin sitoplazmada yıkımı sağlanır. Wnt sinyali varlığında ise sitoplazmada birikmeye başlayan β -katenin, çekirdeğe taşınır (9). Böylelikle hücre proliferasyonunu düzenleyen ve gelişimi kontrol eden çok sayıda genin transkripsiyonunu aktive eder. Bu genlerin çoğu bilinen onkogenler olup kanser tedavisinde güçlü birer hedeftirler (10). Bozulmuş Wnt sinyal yolağı kanserde dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilidir. Kemik iliğindeki Wnt proteinleri ekspresyonu, fetal ve yetişkin hematopoetik kök hücrelerin gelişimini etkiler (11). Özellikle embriyonik dönemde önemli olan Wnt sinyallerinin lenfosit öncüllerinin sağkalım ve proliferasyonunun düzenlenmesinde MKH'ler aracılığıyla rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle anormal Wnt aktivasyonunun, lökomogenezin nedenlerinden biri olduğu öne sürölmektedir (12).

Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışmamızda çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemili hastaların ve sağlıklı vericilerin MKH'lerini blastik hücrelerle kökölture

ederek *in vitro* ortamda kemik iliği mikroçevresini oluşturmayı ve bu mikroçevrede yer alan MKH'lerin blastik hücreler üzerindeki apoptotik etkilerini incelemeyi amaçladık. Bunun için birinde hücre-hücre kontağı olacak şekilde araya membran konulmadan diğesinde ise hücre grupları arasında kontakt olmayacak şekilde araya membran koyarak iki farklı kültür ortamı oluşturuldu ve blastik hücrelerin apoptoz oranları arasında fark olup olmadığı araştırıldı. Ayrıca yine kemik iliği mikroçevresinde MKH'ler aracılığıyla blastların sağkalımında rolü olduğu düşünölen Wnt/ β -katenin sinyal yolağının anahtar molekülü olan β -kateninin MKH'lerdeki ekspresyonu ve apoptotik yolda yer alan Bax, Bcl-2 ve Kaspaz 3 proteinlerinin ekspresyonları immunositokimyasal çalışmalarla gösterildi. Çalışmamız hem çocukluk çağı ALL'li hastaların kemik iliği örneklerinden hem de sağlıklı vericilerin kemik iliği örneklerinden MKH'ler izole edilerek blastlar üzerindeki etkisini apoptotik ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağı açısından gösteriyor olması nedeniyle literatürde yer alan diğeri çalışmalardan farklıdır. Çalışmalarda kullanılan hastaların blastları indüklenmeden ya da özellikleri değıştirilmeden mikroçevrede yer aldığı gibi kültüre edilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda farklı hücre hatları ya da farklı yerlerden kaynaklı MKH'ler kullanılmış ve çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçların hem hastalığın patogenezeine ışık tutacağını hem de gelecekte tedavide kullanılabilecek yeni terapötik yöntemlere yardımcı olacağını düşünöyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoez

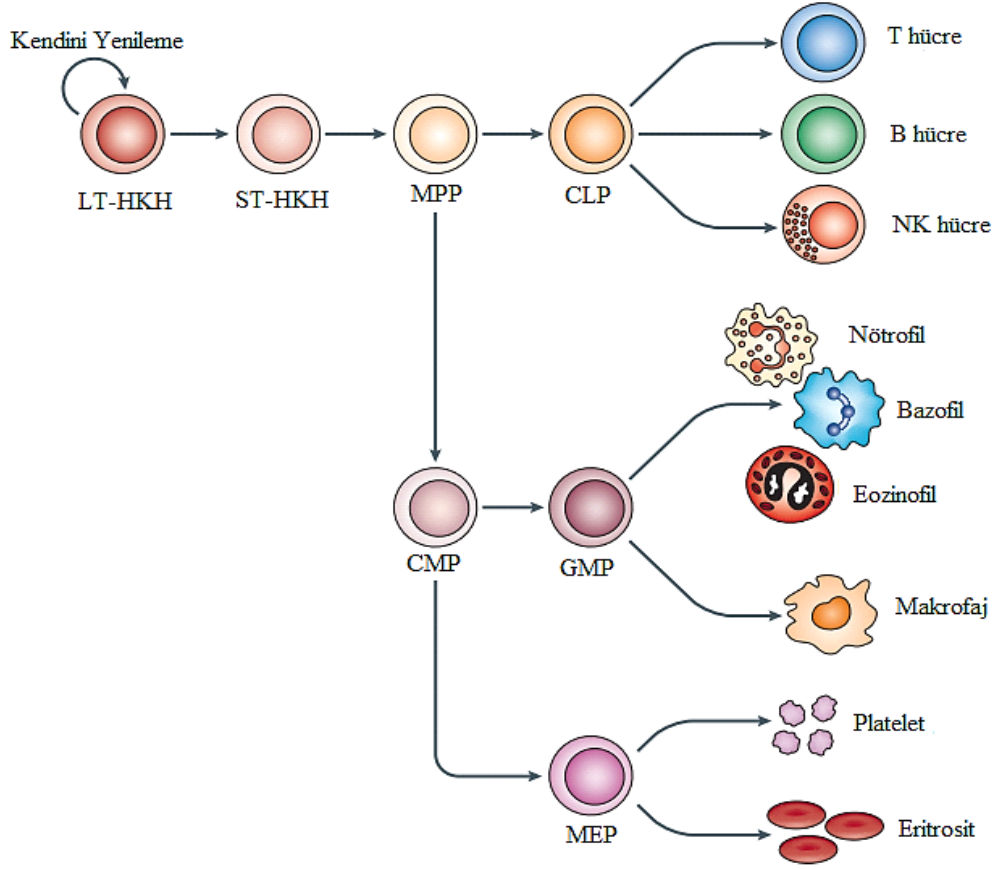
Hematopoez (Hemapoez), organizmanın embriyonik ve yetişkin düzeyde, kök hücreden çok sayıda farklı kan hücresi oluşturmasını tanımlayan bir terimdir. Yetişkin kök hücre tiplerinden biri olan ve bütün kan hücre serilerine dönüşme yeteneğindeki hematopoetik kök hücrenin gelişim, kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerini de kapsamaktadır. Hematopoez için gerekli elemanlar; Hematopoetik kök hücreler, mikroçevre, hematopoetik büyüme faktörleridir.

Embriyogenezin en erken evrelerinde, kan hücreleri Vitellus kesesi mezoderminden gelişmektedir. 28 günden itibaren Aorta/Gonado/Mezonefroz (AGM) bölgesinde küçük hücre gruplarıyla intraembriyonik hematopoez başlar. Bir süre sonra karaciğer ve dalak geçici hematopoetik dokular olarak görev yapar (13). Kemik iliği ise ancak 6.aydan sonra hematopoezin gerçekleştiği primer doku olarak görülür ve tüm erişkin hayatı boyunca aynı şekilde devam eder (14, 15).

Olgun hematopoetik sistem aşamalı olarak farklılaşma yeteneğine sahip multipotent ve unipotent kök hücreleri içerir (16). Bu farklılaşma süreci, normal fizyolojik koşullar altında geri dönüşümsüzdür. Yüksek düzeyde proliferasyon yapabilme yeteneğine sahip bu hücreler, farklı fonksiyonel özelliklerde olgun kan hücrelerinin yapımını sağlarlar (16, 17). Böylece hematopoetik sistemin sessiz fazda sürdürülmesi için gereken miktarda farklılaşmış hücre yapımı sağlanır. Hematopoetik kök hücreler bir veya birden çok seriye farklılaşmaya sınırlanmış progenitör hücrelerden oluşan hiyerarşik düzenin ana kaynağını oluştururlar. Hiyerarşinin en tepesinde olan HKH'ler üzerindeki proliferasyon baskısı en düşük düzeydedir (17). Bu hücrelerin en önemli belirteçlerinden birisi CD34'dür, bu insan kemik iliği hücrelerinin % 0.5-5'inde ifade olur. Erken progenitörlerde bulunurken daha olgun hücrelerde bulunmaz (15). HKH'ler farklılaşmış kan hücrelerinin belirli miktarda

idamesi ve hematopoetik kök hücre havuzunun yenilenmesi için nadir olarak bölünürler (16, 18).

Hiyerarşik düzende HKH'den sonra yer alan multipotent progenitör (MPP) hücreler bütün serilere farklılaşma potansiyelini sürdürürler ancak kendilerini yenileme kapasiteleri sınırlıdır. Hematopoetik kök hücrelerden daha fazla miktarda bulunan MPP hücreler gelişim potansiyeli kısıtlı oligopotent progenitörlere kaynak oluştururlar. Bu hücreler ortak lenfoid progenitör (Common Lymphoid Progenitors, CLP) ve ortak miyeloid progenitörler (Common Myeloid Progenitors, CMP) ile hematopoetik hiyerarşi içerisindeki dallanma noktasını temsil ederler. Sonuçta oligopotent hücreler, bütün olgun kan hücrelerini oluşturacak seri-sınırlı öncül hücrelerin oluşumunu sağlarlar. Ortak lenfoid progenitörler B, T, dendritik ve doğal öldürücü hücreleri içeren olgun lenfoid efektör hücreleri oluştururlarken miyeloeritroid hücre oluşturma potansiyelinden yoksundurlar. Ortak myeloid progenitörler ise miyeloid ve eritroid seri ile dendritik hücreleri yapma yeteneğine sahiptirler (16, 18). Gelişimin daha ileri evrelerinde CMP hücreler CD34 ve Fc (Fragment, cyrstallizable) reseptör ekspresyonlarına göre megakaryosit eritrosit öncülleri (Megakaryocytic/Erythroid Precursor, MEP) ve granülosit monosit öncülleri (Granulocytic/Monocytic Precursor, GMP) olmak üzere iki farklı hücre grubuna bölünürler. Farklılaşma yeteneği sınırlı GMP'ler esas olarak olgun nötrofil, monosit ve makrofaj oluşumunu sağlarken daha az oranda eozinofil, bazofil ve mast hücrelerini meydana getirirler. Megakaryosit eritrosit öncülleri ise eritrositlerin ve daha sonra trombositleri meydana getirecek megakaryositlerin oluşumundan sorumludur (18). Böylece hematopoetik sistemin hiyerarşik düzeni içerisinde bütün serilerde kan hücrelerinin oluşumu ve idamesi gerçekleşmiş olur (Şekil 2.1).



Sekil 2.1.Hematopoetik hiyerarşi modeli. LT-HKH: Uzun süreli (long term) hematopoetik kök hücre, ST-HKH: Kısa süreli (short term) hematopoetik kök hücre, MPP: Multipotent progenitör, CMP: Ortak (common) miyeloid progenitör, CLP: Ortak (common) lenfoid progenitör, MEP: Megakaryosit eritrosit öncülleri, GMP: Granülosit monosit öncülleri (19)

2.2. Çocukluk Çağı Lösemileri

Lösemi, hematopoetik öncül hücrelerin neoplastik transformasyonu sonucu farklılaşma ve olgunlaşma kusuru göstermeleri ile aşırı çoğalma özelliği kazanan hücrelerin kemik iliğini, periferik kanı ve takiben diğer dokuları istila etmesi sonucu normal kan hücrelerinin yapılamaması ile karakterize kemik iliğinin malign bir grup hastalığıdır (21).

Çocuklarda lösemilerin % 97'sini akut lösemiler oluşturur (Tablo 2.1). Lösemi sınıflamaları normal hematopoezin neresinde klonal ekspansiyon olduğunu

anlamaya yöneliktir. Lösemik hücrelerin morfolojik, immüfenotipik, sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler genetik özelliklerine dayanarak çeşitli sınıflandırmalar yapılmış olup son yıllarda bunların kombinasyonları ile lösemilerin alt grupları belirlenmektedir (22, 23).

Tablo 2. 1. Çocukluk çağı lösemilerinde sınıflama (3)

1) Akut Lösemiler (%97) Akut Lenfoblastik Lösemi % 75 -80 : Morfoloji: L1, L2, L3 İmmüfenotip: B hücreli (Progenitor, erken PreB, PreB, B ALL) T hücreli Akut Miyeloblastik Lösemi (AML) /Akut Nonlenfositik Lösemi %20 Morfoloji: M0-M7 Akut Undiferansiye Lösemi < % 0.5 Akut Bifenotipik Lösemi ALL + 2 myeloid antijen (% 6) AML + 2 myeloid antijen (% 17) 2) Kronik Lösemiler (%3) Philadelphia Kromozomu Pozitif Miyeloid Lösemi Jüvenil Miyelomonositik Lösemi

2.2.1. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) kemik iliğinde bulunan lenfoid öncül hücreler olan B ve T progenitör hücrelerin, farklılaşmasının herhangi bir safhasında meydana gelen, çok basamaklı somatik mutasyonlar sonucu gelişen malign bir hastalıktır (24, 25).

Akut lenfoblastik lösemi, çocukluk çağında en sık görülen kanser türüdür. Tüm çocukluk çağı kanserlerinin %25-30'unu, akut lösemilerin ise %80'ini oluşturmaktadır (3). ALL'nin sıklığı ve yaş dağılımı kalıtsal veya çevresel etkenler nedeni ile en düşük Afrika'da olmak üzere dünyanın değişik yörelerinde önemli farklılıklar gösterebilmektedir. Görülme sıklığı en fazla 2-5 yaş arasındadır ve daha sonra sıklık giderek azalır ve yaşamın üçüncü dekadında yeniden artar. Erken çocukluk döneminde ALL'nin sık görülmesinin etiyolojik nedeni açık değildir. Ancak gebelikteki olaylar ve immün sistemin gelişmesi ile ilişkili olduğuna dair görüşler vardır (26).

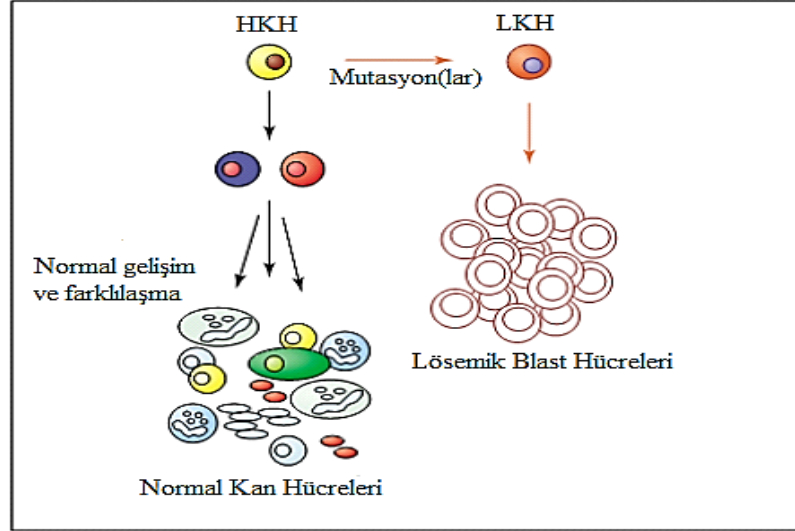
Akut lenfoblastik lösemi, erkeklerde kızlara göre 1,2 oranında daha yüksek sıklıkta görülmektedir. Bu fark puberte döneminde ve T hücreli ALL' lilerde (4:1) daha belirgindir. Ancak seks hormonlarının ALL etyolojisinde herhangi bir rolü bugüne kadar saptanmamıştır. Cinsiyet prognoz açısından önemli bir gösterge olup kızlardaki yaşama oranı daha yüksektir (21). Ülkemizde yılda ortalama 250 olgunun kayıt edildiği Türk BFM Çalışma Grubu protokolü TR ALL-2000'de ortalama yaş 5 ve erkek/kız oranı 1,2'dir (27).

Akut lösemilerin nedeni hala kesin olarak bilinmemekle birlikte lösemi etiyolojisindeki önemli faktörler iyonize radyasyon, kimyasal ajanlar, ilaçlar ve genetik faktörler olduğu düşünülmektedir (3).

Bütün hematopoetik hücreler ortak bir multipotent ana hücreden kaynaklanır. Eritrositler, polimorfonükleer granülositler, monositler ve trombositler gibi periferik kandaki olgun hücreler kemik iliğindeki progenitor hücrelerden tek bir hat üzerinde olgunlaşarak oluşur. Her aşamada farklı hematopoetik büyüme faktörleri stimülasyon ve/veya kontrol görevi yaparlar. Genetik ve epigenetik değişikliklerin devreye girmesiyle lenfoid homeostazından sorumlu genler etkilenir ve immatür öncül hücreler klonal bir şekilde çoğalmaya başlar (Şekil 2.2) (28).

Lösemi kliniği çıkmadan önce, yıllarca küçük prelösemik bir klonda mutasyon olabilir. Normal lenfoid gelişim sırasında, İmmünglobulin (Ig) oluşumu ve TCR gen düzenlenmesi sırasında mutasyon riski artar. ALL'de gözlenen

kromozomal translokasyonlar klonal gelişimde anahtar role sahiptirler. Genellikle translokasyonlar aşırı ekspresyona sebep olan TCR veya Ig lokusundaki bir protoonkogen veya değişik onkogenik etki ile yeni bir kimerik proteinin kırılması sonucu genlerin füzyonu ile oluşur (29).



Şekil 2.2. Lösemik hücrelerden tümör oluşumu (28).

Pediyatrik ALL vakalarının yaklaşık %75'inde kromozomal bozukluklar mevcuttur. B-prekürsör ALL'de 50 kromozomdan fazla hiperdiploidi, 44 kromozomdan az hipodiploidi, kromozomal yeniden düzenlemeler [t(12;21) ETV6-RUNX1 (TEL-AML1), t(1;19) TCF3- PBX1 (E2A-PBX1), t(9;22) BCR-ABL1, MLL geninde yeniden düzenlemeler] olabilir. T-ALL ise NOTCH 1' de aktive edici mutasyonlar ve transkripsiyon faktörlerindeki [TLX1 (HOX11), TLX3 (HOX11L2), LYL1, TAL1, MLL] yeniden düzenlemelerle karakterizedir. Yüksek hiperploidi ve ETV6-RUNX1 iyi prognoz gösterir. Bütün bu yeniden düzenlemeler lökomogenezi başlatıcı olaylar olmasına rağmen lökomogenezi tamamen açıklamaya yetmemektedir. Günümüzde ALL vakalarının çoğunun yapısal ve submikroskopik genetik değişiklikler ve sekans mutasyonlarıyla olduğu bilinmektedir (30).

Kemik iliği mikroçevresinde meydana gelen değişikliklerde hastalığın patogenezi ve seyri önemli yer tutmaktadır. Hematopoetik proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozu kontrol eden düzenleyici genlerdeki mutasyonlar, hücre

sinyal yolağındaki spesifik kinazlar, proteinlerin ekspresyon veya aktivitesini etkileyen protoonkogenlerin aberan ekspresyonu, süpresör genlerin baskılanması ve kodlanan kimerik transkripsiyon ekspresyonu gibi süreçler de ALL patogeneğinde yer alan önemli faktörlerdir. Normal şartlarda hücrede bir sorun varsa veya mutasyon oluşmuş ise hücre apoptoza yönelir. Hücrenin apoptoza girememesi genellikle kanser oluşumunu tetikler. Apoptoza giremeyen hücre istenmeyen yönde farklılaşır, ölümsüzleşir ve malign şekle döner (31).

Lösemi, kemik iliğinden köken alan bir malignansi olması nedeniyle kan sayımında ve periferik yaymada anormallikler sık görülür. Anemi, lökopeni veya lökositoz, trombositopeni gelişebilir. ALL vakalarının %20'sinde lökosit sayısı $50000/\text{mm}^3$ 'ün üzerinde ve % 10'unda ise $100000/\text{mm}^3$ 'ün üzerindedir.

Lösemi tanısında klinik ve periferik kan bulgularının yanısıra kemik iliği aspirasyon ve/veya biyopsi ile değerlendirilmesi temel teşkil etmektedir. Periferik yaymadaki blastlar bazen morfolojik olarak yanıltıcı olabilmektedir. Kemik iliği genellikle hiperselülerdir ama hiposelüler ALL olguları da mevcuttur. Kemik iliğindeki tüm çekirdekli hücreler sayıldığında %25'i aşan lenfoblast infiltrasyonu mevcut olduğunda ALL tanısı konulmaktadır.

ALL'de tedavi tipik olarak remisyon indüksiyonu, intensifikasyon ve idame tedavisi fazlarını kapsar. Remisyon indüksiyon tedavisinin amacı başlangıç tümör yükünün %99'undan fazlasını eradike etmek ve normal hematopoezi sağlamaktır. Konsolidasyon (Güçlendirme) tedavisi; indüksiyon tedavisi sonunda ve normal hematopoez bulguları saptanınca başlanır. Tedavinin bu bölümünün amacı saklı kalabilen tüm blastları temizleyerek olası nüksü engellemektir. Tam remisyon sağlanmasına rağmen vücutta 1×10^{10} kadar lösemik hücre bulunduğu gösterilmiştir.

Lösemi tedavisindeki son yıllardaki gelişmelere karşın, nüksün varlığı hala ciddi bir sorun olarak sürmektedir. Hastaya uygulanan tedaviden (radyoterapi, kemoterapi, kemik iliği nakli) kaçan ve nükse neden olan hücrelerin varlığı "minimal rezidüel hastalık-MRH" olarak tanımlanmaktadır (3, 21).

2.3. Kök Hücre ve Mezenkimal Kök Hücreler

Kök hücre tarihi 1800'lerin ortasında bazı hücrelerin başka hücreleri oluşturabilme yeteneğinin keşfedilmesiyle başlamıştır. İlk olarak Maximow ve Friedenstein tarafından kök hücre çalışmaları yapılmıştır. Maximov tüm kan elemanlarının tek bir hücreden 'kök hücre' den farklılaşabildiğini ve hematopoezle mezoderm arasında gelişim sürecinde bir ilişki olduğunu keşfetmiştir (32). 1963 yılında E.A. McCulloch & J.E. Till, çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılan bu progenitör hücrelerin kök hücreler olduğunu beyan etmişler (33) ve kök hücreleri; "Kendi kendini yenileme kapasitesine sahip ve uygun koşullar altında farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücreler" olarak tanımlamışlardır (34).

Farklılaşmamış kök hücrelerin, başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (self-renewal); tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (multi-lineage differentiation) ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır (35). Bir dokudan elde edilen kök hücrelerin, uygun ortam şartlarında, uygun uyarılarla farklı doku hücrelerine dönüşebilme yetenekleri plastisite (transdiferansiyasyon) olarak tanımlanmıştır (5).

Kök hücrelerin sınıflandırma terminolojisi biraz karışıktır ancak temelde iki grupta incelenebilir. Buldukları yere göre Embriyonik Kök Hücre (EKH) ve aynı zamanda Doku Spesifik Kök Hücre (DSKH) olarak da adlandırılan Yetişkin Kök Hücre olmak üzere ikiye ayrılır. Fonksiyonel olarak gelişimsel potansiyellerine göre ise totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere dört grup altında sınıflandırılırlar (36).

Fertilizasyonda, spermiyum ve ovumun birleşmesi ile oluşan zigot, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonik hücredir. Zigot ve embriyonun 5. gününe kadar olan tüm blastomerlere her şeyi yapabilen anlamında “totipotent hücreler” denir. Tam ve işlev gören bir canlıyı oluşturabilecek tüm ekstra embriyonik, intra embriyonik hücre tiplerine farklılaşabilir. Fertilizasyondan sonra, pre-implantasyon döneminin 5. gününde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücreler pluripotent hücrelerdir. Blastosist; trofoblastik hücreler, blastosöl ve iç hücre kitlesi olmak üzere üç yapıdan oluşmuştur. Embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler pluripotent kök hücreler olup, gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptir; ancak işlev gören bir organizmayı oluşturamazlar. Doku spesifik kök hücreler, multipotent kök hücrelerdir ve bir dokunun birçok hücresine farklılaşabilirler. En iyi tanımlanmış multipotent kök hücreler hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerdir. Unipotent kök hücreler ise tek bir olgun hücreye farklılaşabilen hücrelerdir. (36–38). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda bu sınıflandırmaya *in vitro* ortamda yeniden programlama ile embriyonik kök hücre özellikleri kazandırılmış indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde (IPKH) katılmıştır (39).

Doku spesifik kök hücre sınıfına dahil olan mezenkimal kök hücreler, hem mezoderm orijinli (adiposit, kondrosit, osteosit, miyosit) hem de mezoderm orijinli olmayan dokulara (hepatosit, nöral hücreler ve epitelyal hücreler) farklılaşabilen, hematopoetik olmayan kök hücrelerdir (40, 41, 42, 43). Bu hücreler yaklaşık 40 yıl önce Friedenstien ve arkadaşları tarafından ibroblast benzeri yapışkan hücreler olarak tanımlanmışlardır (32, 33).

MKH’ler kemik iliğinin stromal kompartmanından, yağ dokusundan, plasentadan, umbilikal kord kanından, amniyotik sıvıdan, trabeküler kemikten, diş pulpasından ve iskelet kasından izole edilebilirler (32, 44, 45, 46). MKH’lerin osteoblastik adipojenik ve kondrojenik hücre serilerine farklılaşmalarının yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalarla nöronal ve kardiyomyojenik hücrelere de farklılaşmalarını gösterilmiştir. Ancak MKH’lerin özelliklerinin farklı hastalıklarda değişip değişmediği ya da değişimin nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir (46, 47,

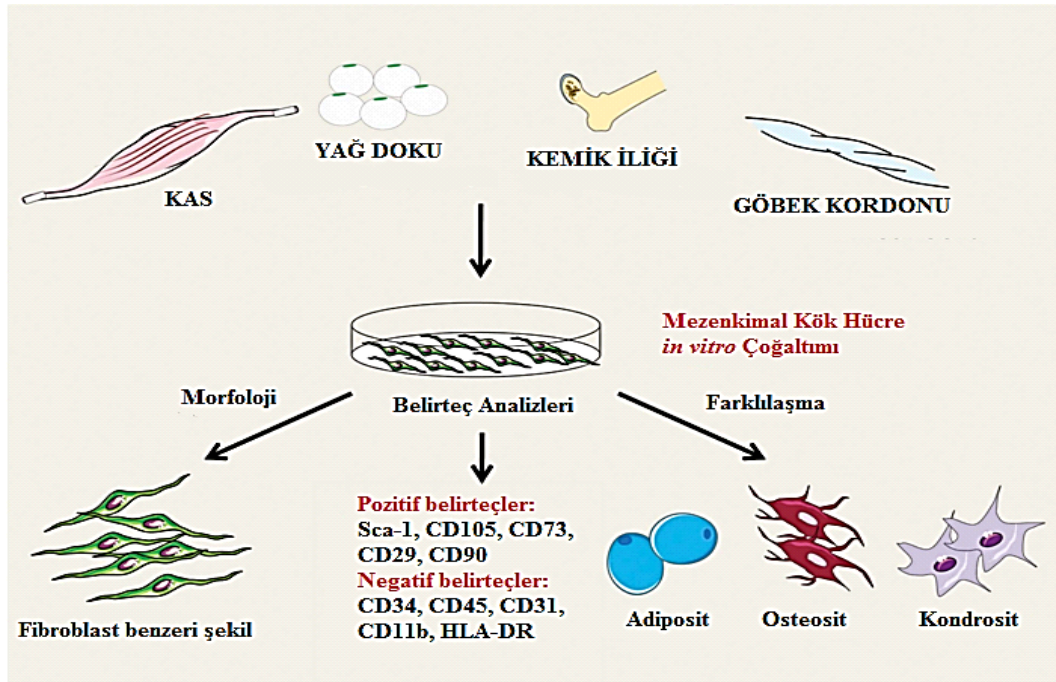
48, 49, 50).MKH'ler kemik iliğinden elde edildikleri tekniğe göre her aspiratta tüm hücreler içerisinde yaklaşık %0,001 - %0,01 oranında sayılmışlardır (40, 50).

Literatürde MKH'lere özel hücresel tek bir belirteç ya da reseptör bulunmamaktadır. Bu hücreler, Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT - International Society of Cellular Therapy) tarafından 3 önemli özelliklerle tanımlanmaktadır. Bunlar aşağıda sıralandığı gibidir:

i) Kültür ortamında plastik yüzeye yapışırılar,

ii) CD73 (SH3 ve SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2;endoglin) gibi yüzey belirteçlerini eksprese ederken, CD14, CD34, CD19, CD11B, CD45 gibi hematopoetik belirteçleri ve HLA-DR(human leucocyte antigen-DR) 'yi eksprese etmezler,

iii) Osteosit, kondrosit ve adiposite farklanma kapasitesine sahiptirler (Şekil 2.3) (51, 52, 53, 54).



Şekil 2.3. Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri (44)

MKH'ler, kemik iliği mikroçevresinin önemli bir hücresel bileşenidir. Hematopoetik kök hücrenin (HKH) stromaya tutunması (ekstraselüler matrikse ve stromal hücrelere), çeşitli hücresel faktörlerin (sitokinler, kemokinler) salınımı ile hematopoetik öncü hücrenin olgun hücreye farklılaşması veya inhibisyonu ile kök hücrenin siklusun G0 fazında kalarak kök hücre rezervi oluşturması, gen transferi kolaylığı (55), kendini yenilemesi ya da gerektiğinde diğer dokulara mobilizasyonu, migrasyonu gibi biyolojik fonksiyonlarına önemli katkı sağlamaktadır (32, 56, 57).

MKH'ler hemen hemen tüm dokulardan izole edilebilir ve *in vitro* ortamda etkin olarak çoğaltılabilirler. *In situ* ortamdaki biyolojik fonksiyonları ve özellikleri hala açıklığa kavuşturulmayı beklese de *in vitro* da MKH'lerin bazı hücre hatlarına farklılaşma potansiyeli olduğu bilinmektedir. MKH'lerin ölmüş ya da fonksiyonel olmayan hücrelerle yer değiştirerek *in situ* ortamda, dokuda hücresel homeostazın sağlanmasında önemli olduğu düşünülmektedir (52). Bu biyolojik özelliklerinden ötürü hücre bazlı tedavilerde otolog ya da allojenik hücreler kullanarak hasarlı hücreleri yerine koyma, tedavi etme veya fonksiyonunu iyileştirme gibi durumlarda kullanılabilirler. MKH'lerin klinik uygulamalarda kullanılması ve diğer kök hücrelere göre avantajı bu hücrelerin farklılaşma, immuntolerans ve transformasyon gibi özelliklerinin varoluşundandır. MKH'lerle ilgili önemli özellikler aşağıdaki gibidir:

(1) MKH'lerin immun düzenleyici özellikleri ve doku onarıcı fonksiyonları inflamatuvar sitokinler tarafından indüklenir.

(2) MKH'ler doku onarımını kolaylaştırmak ve immun homeostazı sürdürmek için çeşitli büyüme faktörleri ve immun baskılayıcı molekülleri eksprese ederler.

(3) İmmunomodulatuvar özellikleriyle immun sistemde düzenleyici olarak görev yapabilirler (44, 52, 58)

Mezenkimal kök hücrelerin bağışıklık sistemini düzenleme yetenekleri ilk olarak Bartholomew ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (59). Fakat kesin mekanizma hala anlaşılammıştır. Doğrudan hücre hücre temasının ya da immun baskılayıcı sitokinlerin salınmasının rol oynadığı ileri sürülmektedir (60).

MKH'ler bağımsızlık sistemi hücrelerinin büyük bir kısmı ile etkileşime girer (52). MKH' ler antijen sunucu hücreler (makrofajlar, dentritik hücreler ve B lenfositler) üzerinde bulunan bir molekül olan MHC II (Major Histocompatibility Complex II) kompleksini bulundurmazlar. CD40, CD80, CD86 gibi ko-stimulator molekül ekspresyonları yoktur. MHC II negatif MKH'ler allojenik lenfositlerde proliferatif bir cevap oluşumuna yol açmazlar. Bu da MKH'lerin immün sistemden kaçmalarını sağlamaktadır (61). Mezenkimal kök hücreler, dentritik ve T hücre alt grupları DC1/Th1 ve DC2/Th2 tarafından üretilen sitokinleri düzenler, antijen sunan hücrenin olgunlaşmasını ve aktivasyonunu engeller ve CD4+CD25+ düzenleyici T hücre sayısını artırır (62). T hücreler ve MKH' ler arası etkileşimler Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonunun (HKHT) klinik uygulamalarında önemlidir. HKHT ve immün sistem ilişkili hastalıklardan sonra oluşan Graft Versus Host Disease (GVHD) komplikasyonları MKH'lerle en aza indirgenmektedir. MKH'ler ayrıca B hücrelerinin, NK hücrelerinin ve dentritik hücrelerinde fonksiyonlarını inhibe ederler (63, 64, 65, 66). MKH'lerin ana immünespresif fonksiyonları transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) (67), hepatosit büyüme faktörü (68), nitrik oksit (69), HLA-G (70), indoleamine 2,3- dioxygenase (IDO) (71) gibi çözünebilir faktörler tarafından indüklenir (Tablo 2.2). Ayrıca bu hücreler direkt hücre-hücre etkileşimiyle de immünespresif etkilerini gösterirler (72). T hücre proliferasyonunun MKH'lerce inhibisyonu hem hücre-hücre teması hem de IFN γ interlökin 1 β gibi çözünen faktörlerin salınımı aracılığıyla olduğu görülmektedir (73, 74).

Tablo 2.2. MKH'ler tarafından üretilen immünmodulator moleküller (32)

Molekül	Fonksiyonu
Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β)	T lenfosit proliferasyonunu baskılar
Hepatosit büyüme faktörü (HGF)	T lenfosit proliferasyonunu baskılar
Nitrik oksit (NO)	T lenfosit fonksiyonunu ve cevap oluşturmalarını baskılar
İnsan lökosit antijen G (HLA-G)	Naif T hücre proliferasyonunu baskılar
İndoleamine 2,3- dioxygenase (IDO)	IDO aracılı T hücre inhibisyonu, Antijen sunucu hücrelerde T hücre inhibitörü
Kemokinler: CCL-2, ICAM-1, CXCL-10,	T hücrelerin MKH'lere doğru migrasyonunu

CCL-8	sağlarlar
-------	-----------

Mezenkimal kök hücrelerin, anti-immün globulin (Ig) antikorları, antiCD40L antikorları ve sitokinler (IL-2 ve IL-4) ile aktive edilmiş B hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Antikor üretimi ve CXCL12 ve CXCL13 karşı kemotaktik cevap olarak CXCR4, CXCR5, CXCR7 kemokin reseptörlerinin salımı olan B hücre fonksiyonları MKH'ler tarafından bozulmaktadır (63). Mezenkimal kök hücreler sadece IFN γ varlığında B hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir (40, 44, 46).

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanım için belki de en avantajlı özelliklerinden birisi, bu hücrelerin immunojenitesinin düşük olması ve immunsupresif olmalarıdır (32). Ancak immun sistemin neredeyse tüm hücreleri ile etkileşime girerek immun baskılama gösteren MKH'ler tümörlerin kaçmasını da kolaylaştırır. MKH'lerin kanser ilerletici etki gösterdiğine dair var olan çalışmalarda neden olarak gösterilen mekanizmalardan biri immun baskılamadır (75). MKH'lerin tümör oluşumunu desteklemelerinin bir diğer sebebi de kanser hücrelerinin MKH'ler üzerinde oluşturduğu transforme edici etkiden kaynaklanır. Tümör stroması ve MKH'ler arasındaki etkileşimler MKH'lerin karsinoma bağlantılı fibroblastlara farklılaşmasına sebep olabiliyor. Örneğin MKH'lerin meme kanserinde karsinoma bağlantılı fibroblastlar (CAF) olduğu düşünülmektedir (76). Yukarıda belirtilen özelliklere sahip MKH'ler le ilgili hala yanıtlanmamış birçok soru bulunmaktadır (44).

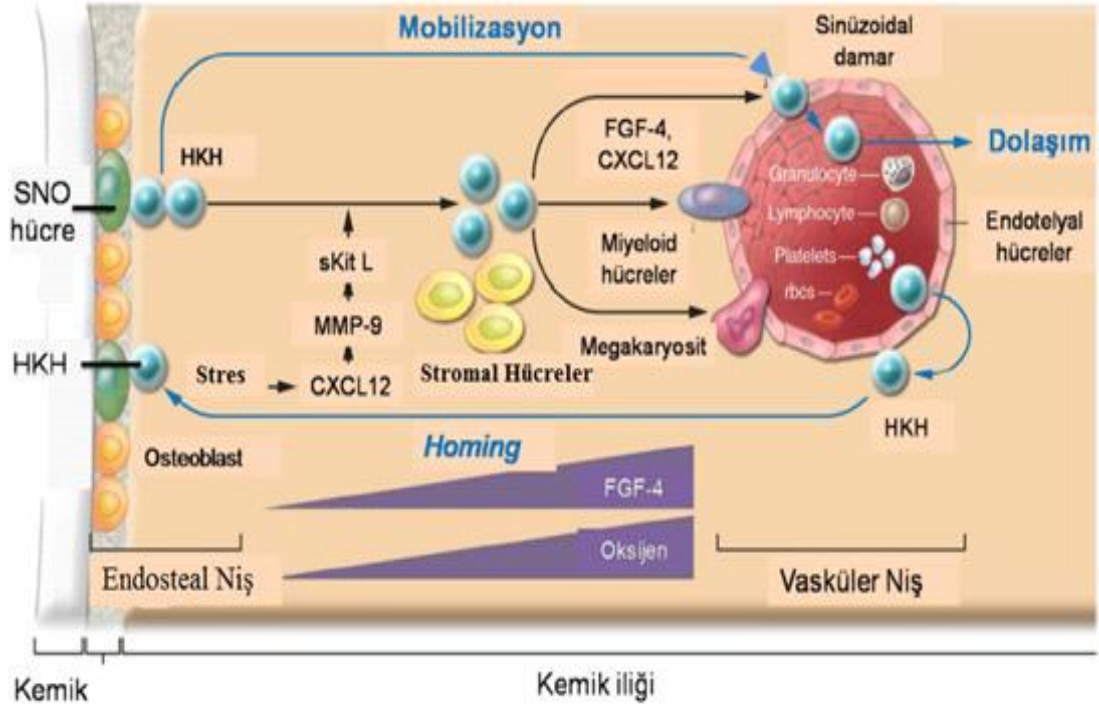
2.4. Kemik İliği (Kİ) Mikroçevresi

Kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerinin temini ve sürdürülmesi özelleşmiş bir mikroçevre gerektirmektedir. Destekleyici hücreler, bu hücrelerden sağlanan sinyaller, salınan solubl faktörler, ekstrasellüler matriks molekülleri, ayrıca parakrin nöroendokrin etkilerin de katkısıyla oluşan özel mikroçevre 'kök hücre nişi' olarak tanımlanmaktadır (77, 78). "Niş" kök hücrenin kendi kimliğini sürdürmesine imkan veren ve mikroçevresini oluşturan özelleşmiş bir bölge ve etrafındaki hücre grubunun tamamı olarak tanımlanmaktadır.

Hematopoetik kök hücreler kemik iliğindeki özellesmiş mikroçevrelerde özgül mezenkimal kökenli stromal hücreler (osteoblast, fibroblast, endotelyal hücre, adiposit, vb.) ile HKH ve progenitörleri ile yakın etkileşim içerisinde bulunurlar. Hematopoetik kök hücrelerin kendilerini yenilemesi, hücre siklusunun G0 evresinde sessiz olarak kalmaları, adezyonları, proliferasyonları, olgunlaşmaları, farklılaşmaya yönelmeleri, Kİ'den ayrılıp dolaşıma girmeleri (mobilizasyon) dolaşımdan Kİ'ne geri dönmeleri (homing) ve yerleşimleri (engraftment) gibi birçok karmaşık sürecin düzeni de hematopoetik kök hücre nişlerinde sağlanmaktadır (78, 79).

Kemik iliğinde HKH'lerin farklı fonksiyonlarını düzenleyen iki ayrı türde niş; endosteal niş (osteoblastik niş) ve vasküler niş (endotelyal niş) bulunur. Bu iki niş birbirinden fiziksel olarak tamamen ayrı olmayıp birbirleriyle bağlantılıdır. HKH'ler farklı koşullar altında iki nişten birini kullanırlar (78).

Endosteal nişteki özgül mikroçevre, hücreler ve salgıladıkları faktörler HKH'lerin sessiz (G0) fazda, endosteal nişe tutunmuş halde farklılaşmadan yaşamlarını sürdürmelerini ve yerleşimlerini sağlarlar. Mezenkimal kök hücrelerden gelişen ve kemik formasyonunda rol alan osteoblastlar endosteal nişin temel bileşenini oluşturur (78) Osteoblastlar hücre bağımlı, matriks bağımlı ve çözünmüş (solubl) sitokinler sentezleyerek HKH fonksiyonlarını modüle ederler. Bunların en önemlileri G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-6, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), CXCL12, IL-3, FLT ligand ve kök hücre faktörü (Stem cell factor, SCF)'dür. Aynı zamanda bu hücreler adezyon molekülleri de eksprese ederler (Sekil 2.4). CD34, CD44, ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule-1) , VLA-4 (very late antigen), VLA-5, PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule), LFA1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) ve LFA-3 bu grubun önemli örnekleridir (80).



Şekil 2.4. Vasküler ve endosteal niş (78)

Vasküler niş hematopoetik kök ve progenitör hücelere hormon, besin, oksijen ve büyüme faktörlerince zengin bir ortam sağlayarak HKH fonksiyonlarını düzenler. Buradaki HKH'lerin kandaki faktörlere sürekli maruz kalması, onların dolasımından gelen sinyalleri (stres, inflamasyon, sitotoksik ajanlar, vb.) anında algılamalarını ve yanıt vermelerini sağlar (79). Ayrıca, vasküler niş HKH'lerin mobilizasyonunu ve dolasımından kemik iliğine dönerek yerleşmelerini (homing) ve bu süreçte transendotelial geçişlerine yardımcı olur. Hematopoetik progenitör hücelerin vasküler nişe toplanması temel düzeyde fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor-4, FGF-4)'ne ve CXCL12'ye bağımlıdır. Aynı zamanda vasküler nişte yüksek, osteoblastik nişte düşük olan FGF gradienti HKH veya progenitörlerin vasküler alana toplanmasında etkilidir (79). CXCL12 ise hematopoetik hücelerin transendotelial göçünde etkin bir kemotaktik faktördür (78). Kemik iliği endotel hüceleri de CXCL12, VCAM-1 ve selektinler eksprese ederek HKH'lerin mobilizasyonunda, dolasımından kemik iliğine dönmelerinde ve yerleşimlerinde rol alırlar (80).

2.4.1. Lösemide Kemik İliği Mikroçevresi

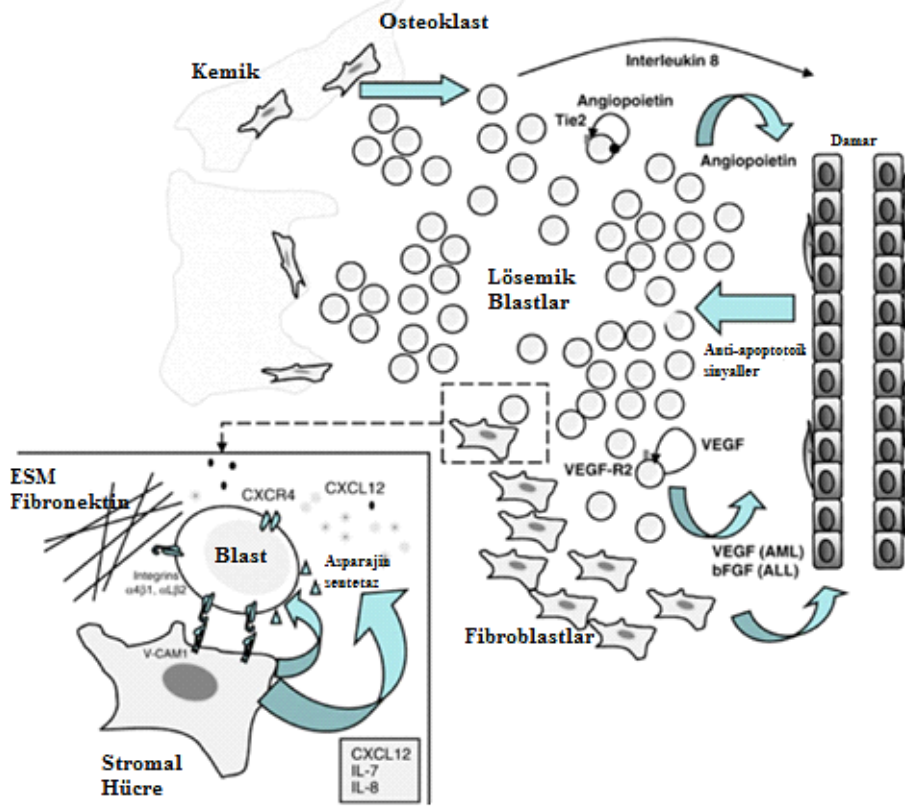
Sağlıklı dokuda, stroma tümör oluşumuna karşı bariyer fonksiyonu görmekteyken, transforme tümör hücrelerinin varlığında meydana gelen değişiklikler sonucu kanser progresyonunu destekleyen birçevre haline gelebilir. Hipoksi, ortamın asiditesi ve büyüme faktörlerinin varlığı gibi yerel değişiklikler, tümörün şekil almasını ve gelişimini etkiler (81). Organların fonksiyon gören hücreleri ve destek görevi gören stroması vardır. Stromayı proteoglikanlar, hyaluranik asit, fibröz proteinlerden (kollajen, laminin, fibronektin gibi) oluşan ekstraselüler matriks ve stromal hücreler oluşturur. Stromal hücreler ise mezenkimal destek hücreler (fibroblast, adiposit gibi), vasküler sistem hücreleri ve immün sistem hücrelerinden oluşur. Ayrıca stromada büyüme faktörleri, kemokinler, sitokinler gibi birçok peptid faktör de bulunur. Stroma, organ gelişimi için gereklidir (82). Benzer şekilde stromanın farklı komponentleri tümör progresyonunu etkiler. Günümüzde tümör stromasını hedefleyen kanser ilaçları yoğun bir şekilde araştırılmakta, hatta bevacizumab gibi bazı ilaçlar FDA tarafından onaylanmıştır.

Lösemnin köken aldığı kemik iliği ise hematopoezde gerekli olan sitokin ve büyüme faktörlerinin yüksek konsantrasyonda bulunduğu dinamik bir mikroçevredir. Buda onu kanser hücresi yerleşimi için oldukça elverişli kılmaktadır. Vasküler nişin bozulduğu durumlarda immatür hücreler dolaşıma geçer. Lösemide de fizyolojik niş yapısı bozulduğundan blastların dolaşıma geçmesi kolaylaşır (83).

Sitokin ve büyüme faktörlerinin lösemik hücre sağ kalımında rolü tam olarak bilinmemekle beraber kompleks ve dinamik ağlar oluşturdukları, böylece lösemik blastlar ve stromal hücrelerin yakın etkileşimi olduğu düşünülmektedir (83).

Lösemik hücrelerin çoğalmasıyla, normal hematopoetik progenitör hücrelerin yerleştiği kemik iliği nişleri bozularak lösemik hücreler yeni bir mikroçevre oluşturur (84). Lösemik kök hücreler belirgin bir şekilde HKH'lere benzediği için kemik iliği mikroçevresi ile etkileşimleri de benzerdir (85). SDF1 α ve lösemik progenitör hücrelerdeki reseptörü CXCR4'ün etkileşimi sonucu kemik iliği mikroçevresinde

'homing' gerçekleşir. Lösemik kök hücreler CXCR4 reseptörleri sayesinde güvenli ve elverişli nişlere yerleşir (86).



Şekil 2.5. Lösemik blastlar ve kemik iliği stromal hücreleri arasındaki etkileşimler (83)

Lösemik blastlar ve stromal hücreler vasküler endotelial büyüme faktörü(VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve protümoral parakrin ve otokrin etkileri etkileri olan diğer proanjyogenik faktörleri üretirler. Tedavi sonrasında rezidüel hastalığa sebep olan dirençli blastların oraya yerleşmesini ve adezyonunu sağlayan integrinler ve CXCR4 blastlar için çok önemlidir. Ayrıca ALL mikroçevresi interleukin düzenleyiciler ve asparajinaz sentetaz gibi tedaviye direnç gösteren mekanizmalara sebep olan faktörler açısından zengindir (83).

2.5. Apoptoz

Eski Yunanca'da "yaprak dökümü" anlamına gelen apoptozis, ilk olarak 1972 yılında İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie, tarafından "canlılarda hücre azalmasının özgün bir tipi" olarak tanımlanmıştır (87). Apoptozis, biyolojik ömrünü tamamlamış veya genetik yapısı bozulmuş hücrelerin komşu hücrelere zarar vermeden yok edilmesinde kullanılan, sıkı şekilde genetik ve biyokimyasal olarak kontrol edilen programlı bir ölüm şeklidir. Aynı zamanda embriyonik dönemde de bazı dokuların diferansiyasyonunda bazı dokuların ise involüsyona gitmesinde önemli rol oynar. Apoptotik sinyali alan hücrede genetik olarak kodlanmış olan apoptotik program çalışmaya başlar ve bir seri kontrollü biyokimyasal reaksiyonlarla hücre ölümü gerçekleşir.

Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan kalsiyum (Ca^{+2}) apoptozda da önemli rol oynar. Hücre içindeki kalsiyum iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptoza götürmektedir. Sitoplazmadaki kalsiyum iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos, ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptoza gitmesine neden olur (88).

2.5.1 Apoptoz Süreci ve Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

Apoptoz süreci, hücre ölümüne neden olan uyarı ile başlar ve enerji bağımlı kaskad ile sona erer. Bu süreç, 4 faz halinde özetlenebilir:

1. Erken veya başlangıç fazı: Apoptoz, apoptotik cevaba neden olan uyarı ile başlar. Apoptotik cevap, hücre dışı bir sinyalin hücre yüzey reseptörlerini uyarmasıyla tetiklenebileceği gibi, ilaçlar, radyasyon veya toksinlerin neden olduğu hücre içi uyarılar ile de tetiklenebilir,

2. Sinyal transferi fazı: Sinyal veya metabolik durumun algılanması ve bu algılanan sinyal veya metabolik durumun hücre ölüm efektör sistemine iletilmesi,

3. Efektör faz: Kaspaz sisteminin aktivasyonu

4. Hücre ölümünden sonraki faz: Hücrelerin kromatin veya DNA'larının sindirimini ve ölen hücrelerin fagositik hücreler tarafından tanınarak yok edilmelerini içerir (89).

Yüzey Yapılarının Kaybı:

Apoptoza uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır.

Hücre Büzülmesi:

Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (91).

Kromatin Yoğunlaşması:

Genellikle çekirdek büzülür. Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (92).

Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması:

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür. Apoptoz için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfatidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfatidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (93).

2.5.2. Apoptozun Moleküler Düzenleyicileri

Apoptozun her basamağı bir çok proteinin birlikte çalışmasını gerektirir. Bu proteinler kaspazlar, Bcl-2 ailesi, p53 ve TNF ailesidir. En etkili proteinazlar kaspazlardır.

Kaspazlar, tek polipeptit zinciri halinde sentez edilirler ve üç tane bölgeyi vardır: efektör ölüm (death effector domain: DED), kaspaz toplama (caspase recruitment domain: CARD) ve ölüm bölgeleridir (death domain: DD). Tüm kaspazlar hücre içinde inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik işlemlerle kırılarak aktif olurlar. İnaktif kaspazların aktivasyonu; granzim B aracılığıyla, sitotoksik T hücre granüllerinde bulunan aspartata özgü serin proteinazlar aracılığıyla veya aktif olan kaspaz proteininin inaktif olan kaspaz ile etkileşimi sonucu gerçekleşebilir (89).

Ölüm reseptörleri aracılığıyla tetiklenen apoptotik sinyal, kaspaz 8 veya kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspazların aktivasyonunu sağlarken mitokondriyal apoptotik sinyaller kaspaz 9'u aktif hale getirir. Daha sonra bu kaspazlar diğer kaspazları aktiveleştirerek proteolitik bir zincirleme reaksiyona sebep olurlar. Bu zincirleme reaksiyon sonunda efektör kaspazlar olan kaspaz 3, 6 veya 7 aktive olur. Bu aktivasyon, nükleaz inhibitörü, hücre iskeleti ve önemli hücre proteinlerinde bölünmeye yol açarak DNA'da parçalanmaya ve tipik morfolojik değişikliklere neden olur. Yaşayan hücrelerde kaspaz aktivasyonu apoptoz inhibitör proteinleri (IAP) adı verilen hücre proteinleri aracılığıyla kontrol altında tutulurlar (94).

Bcl-2 proteinleri apoptoz regülasyonunda; hücre yüzeyi ile hücre içi ölüm sinyalleri arasında denetim noktası olarak, apoptozom oluşum safhasında ve kaspaz zincirleme reaksiyonun aktivasyonunda önemli rol oynar (95). Bcl-2 ailesi iki düzineden daha fazla üyeye sahiptir ve birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri apoptozu tetikleyici (en iyi olarak bilinenler: bax, bid, bcl-Xs, bad, bim, bak, bok, PUMA, NOXA), diğeri ise apoptozu baskılayıcı (en iyi olarak bilinenler: bcl-2, bcl-X1, Mcl-1) etkiye sahiptir. Bcl-2 ailesinin üyeleri BH1 (Bcl-2 Homology 1), BH2, BH3, BH4 bölgelerinden en az birini içerirler (38). Apoptozu tetikleyen üyeler kendi aralarında; BH1, BH2, BH3 bölgelerinden her üçünü bulunduranlar (Bax, Bak) ve sadece BH3 içerenler (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Apoptozu baskılayan üyelerin hepsi bölgelerin dördüne sahiptirler. Ölüm sinyali olmadığı zaman Bcl-2 proteinleri hücre içinde ayrı kompartmanlarda bulunurlar. Ölüm sinyali alındığı zaman, apoptoz indükleyen üyeler değişime uğrarlar, daha sonra mitokondrinin dış membranına entegre olurlar ve mitokondriden apoptozu başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin salıverilmesine sebep olurlar. Bu olaylar gerçekleşirken apoptozu baskılayan üyeler ise inaktif durumdadırlar (96).

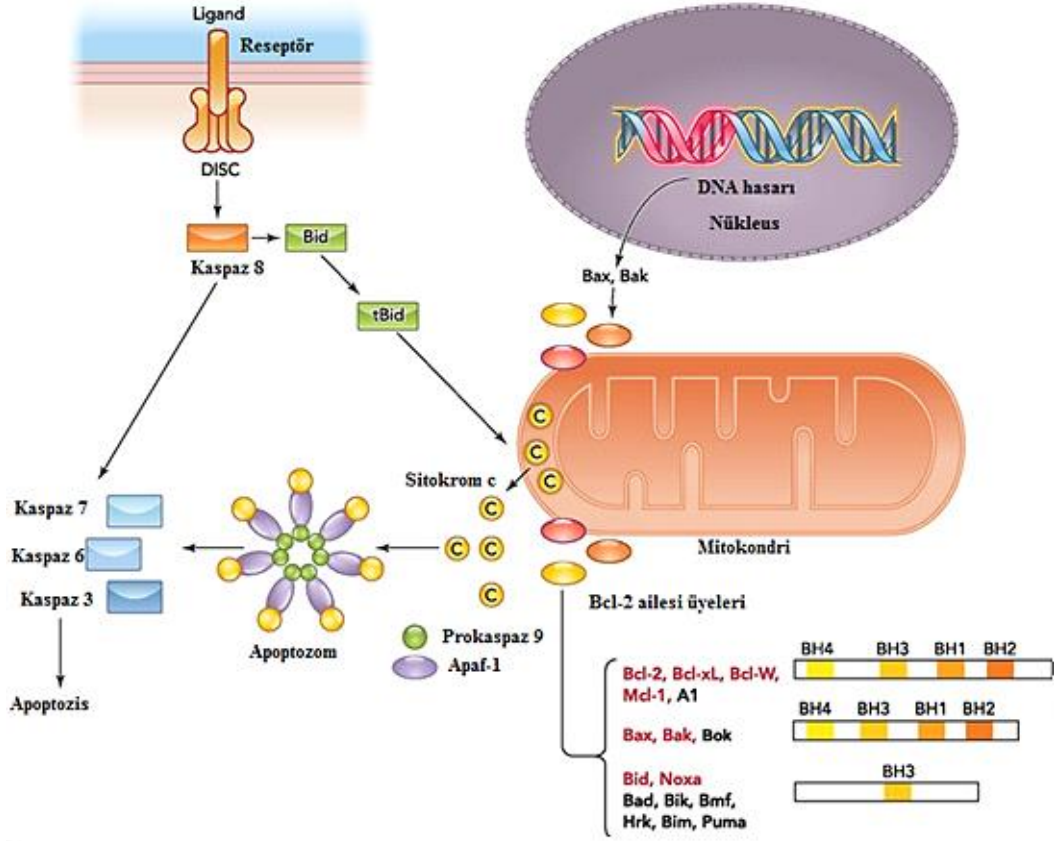
2.5.3. Apoptoz Sürecinin Hücre İçi veya Hücre Dışı Uyaranlarla Tetiklenmesine Göre Değerlendirilmesi

Hücreler, hücre içi veya hücre dışı çevrede meydana gelen büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, HIV, kemoterapi, radyasyon, yüksek doz glikokortikoid, Fas ve TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu ve oksidatif stres gibi hücre ölüm uyaranları ile tetiklenerek iki ayrı yol ile apoptozu giderler. Bu ana yollardan birisi ekstrinsik yol; hücre dışı ölüm uyaranları ile tetiklenen reseptör aracılı apoptoz, diğeri ise intrinsik yol; hücre içi uyaranlar ile tetiklenen mitokondri aracılı apoptozdur (97).

2.5.3.1. Ekstrinsik Yol (Reseptör Aracılı Apoptoz)

Ekstrinsik yolda apoptoz, hücre ölüm reseptörleri olan Fas ve TNF-R1'in kendi ligandları ile etkileşime girmesi sonucu başlar. Fas ligandı (Fas L), sitotoksik T lenfositlerde ve doğal öldürücü (natural killer) hücrelerde bulunur. TNF-R1'in ligasyonu, TNF-R1'e TNF'nin bağlanması ile gerçekleşir. Fas ve TNF-R1 kendi ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olurlar. Fas reseptörü, birbirine komşu iki Fas ligandının birbirleriyle bağlanması sonucu trimer kompleks halinden hexamer kompleks haline dönüşür. Daha sonra, Fas reseptörü kendisinin intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan FADD (Fas associated death domain) ile, TNF-R1 ise kendi intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan TRADD (TNF-R1 associated death domain) ile etkileşime girer. Böylece ölüme sebep olan sinyal kompleksi (death-inducing signalling complex: DISC) oluşur. Bu kompleks, prokaspaz 8'in efektör ölüm bölgesi (death effector domain: DED) ile birleşerek prokaspaz 8'in aktif formu olan kaspaz 8'in oluşumuna neden olur. Kaspaz 8; ya prokaspaz 3'ü aktive ederek hücre ölümüne sebep olur ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'in c-terminal bölgesini keserek aktif formu olan tBid'in oluşmasına ve böylece apoptozun intrinsik yola doğru ilerlemesine neden olur (98).

Hücreler, bu iki yoldan birisine daha fazla yatkındırlar. Tip 1 hücreler (lenfositler), kaspaz 3 aktivasyon yolunu tercih ederken, Tip 2 hücreler (hepatositler), intrinsik yola doğru ilerlemeyi tercih ederler (99).



Şekil 2.6. İnrinsik ve ekstrinsik apoptozi yolağı (100)

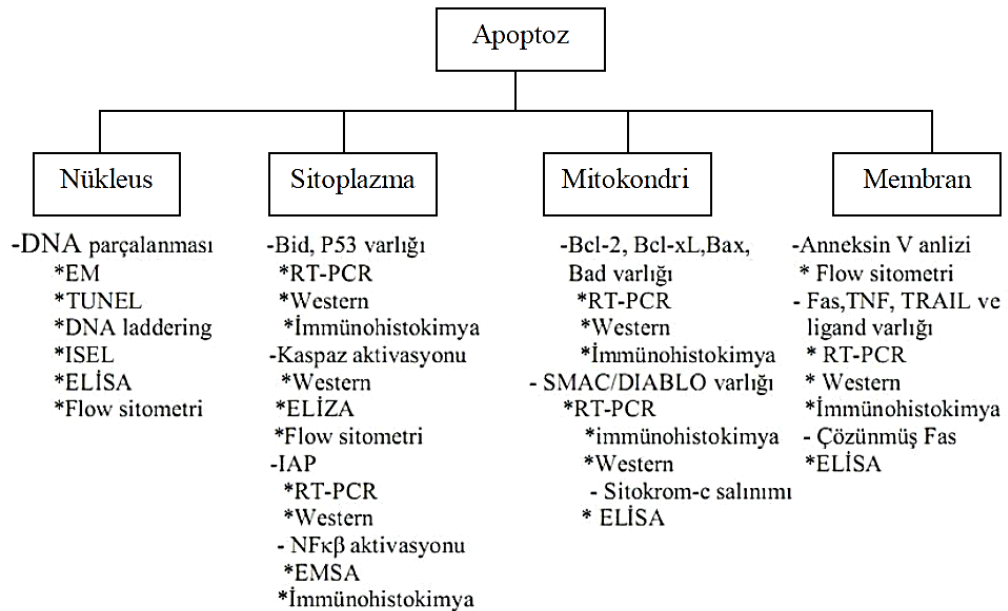
2.3.6.2. İnrinsik Yol (Mitokondri Aracılı Apoptoz)

Sitotoksik ilaçlar, oksidatif stres, iyonize radyasyon, DNA hasarı, büyüme faktör eksikliği gibi nedenlerle oluşabilen ölüm sinyali, Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri (bid, bad, bim, bax, PUMA, NOXA) tarafından mitokondriye taşınır. İnrinsik yolun en önemli bölümü, mitokondri dış membran geçirgenliğinde oluşan artıştır (MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization) (101). Hangi yol ile olursa olsun ölüm sinyalinin, MOMP oluşumunu gerçekleştirebilmesi, mitokondriden apoptozun aktivasyonuna neden olan başta sitokrom-c olmak üzere Smac/diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI), AIF (apoptosis inducing faktor) gibi maddelerin salınımına sebep olur.

Sitokrom-c; Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom adı verilen oligomerik Apaf-1 kompleksi (Apaf-1 + sitokrom-c + ATP + Prokaspaz 9)'nin oluşumunu sağlar. Aktifleşen kaspaz 9, pro-kaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD: inhibitor of caspase- activated deoxyribonuclease) inaktif hale getirir. Böylece ICAD'ın başladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD: caspase activated deoxyribonuclease) serbestleşir. CAD, apoptozun karakteristik bulgularından olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına sebep olur (93).

2.5.4. Apoptoz Belirleme Yöntemleri

Apoptoza giden hücreleri saptama yöntemleri, bakılan kriterlere ve duyarlılığa bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Aşağıdaki tabloda gösterilen yöntemlerin bazısındaki temel noktalar şunlardır:



Şekil 2.7. Her bir yöntemin, apoptoz sürecinde görev alan organellere göre dağılımı (102).

Apoptoz Tayininde Kullanılan Flow Sitometrik Yöntemler:

- Hücre büyüklük ve granülaritesindeki değişiklikler: Işık saçınımının analizi
- Plazma membran geçirgenliğindeki değişiklikler: Hoechst 33342 ve PI (Propidyum iyodür) ile boyama
- Hücre yüzeyindeki değişiklikler: Annexin V bağlanması, F-aktin kaybı
- Mitokondri ve lizozomdaki değişiklikler: Rhodamine 123 ve PI ile boyama, JC-1 ile boyama, Lizozom proton pompası
- DNA fragmentasyonu: TUNEL yöntemi, Sub G1 pik ve DNA analizi
- Kaspaz aktivasyonu
- Hücre içi kalsiyum değişikliklerinin ölçümü (103).

2.5.4.1. Annexin V/ PI ile Apoptoz Tayini

Apoptoz esnasında meydana gelen hücre yüzeyindeki değişiklikler flow sitometri yöntemiyle belirlenebilir. Normalde fosfolipidler, fosfatidilkolin ile birlikte, plazma membranının iç ve dış kısmına asimetrik olarak yerleşmişlerdir. Sfingomiyelin lipid tabakanın dışında yer alırken fosfatidilserin, sitozol ile yüz yüze tabakada yer alır. Apoptoza giden hücrelerde plazma membranındaki fosfolipid asimetrisi kaybolur. Plazma membranının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin yüzeye çıkar. Bu olay hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptozun erken aşamalarında görülmektedir. Fosfatidilserinin ortaya çıkması ölmekte olan hücrelerin tespitinde güçlü bir marker olarak ortaya çıkar. Annexin V, kalsiyum varlığında fosfatidilserine güçlü bir şekilde seçici olarak bağlanır. Annexin V' in FITC ile konjuge edilmesiyle flow sitometride apoptotik hücreler tespit edilebilir. PI ise ölü hücrelerin belirlenmesini sağlayan bir boyadır. Annexin V-FITC ve PI (Propidyum iyodür) ile hücrelerin aynı anda boyanması ölü ve canlı hücrelerin ayırımına imkan sağlar (103).

2.5.5. Apoptoz ve Lösemi

Günümüzdeki kanser çalışmaları özgün olarak kanser hücrelerini etkileyen ancak toksik etkisi minimal olan biyolojik mekanizma tabanlı yollar üzerinde

sürdürülmektedir. Bunlardan umut vaadeden ve potansiyel olarak önemli yeni yaklaşım: programlı hücre ölümünün proapoptotik reseptörler ile uyarılmasıdır.

Apoptoz vücutta artık ihtiyaç duyulmayan veya geri dönüşümsüz hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Apoptoz basamaklarındaki düzenin bozulması kanser patogenezinin önemli bir bileşendir (104).

Normalde apoptotik tetiği çeken özgün mekanizmaların bozulması ile kanser hücreleri apoptozu indükleyici genomik değişikliklere sahip olmasına rağmen yaşamaya devam eder ve çoğalır. Hematopoetik hücreler gibi hızlı bölünen dokularda homeostazi sağlamak için apoptotik mekanizmalara ihtiyaç duyulur. Bu mekanizmadaki bozukluklar miyelodisplazi, anemi, lösemi, lenfoma, myeloproliferatif hastalıklara neden olur. Apoptoz sitotoksik T lenfositlerin, NK hücrelerinin hücre ölümü tetiklemesinde görev alır (105).

DNA hasarının tespiti ve apoptozun başlatılmasında anahtar yol olarak rol alan p53 sıklıkla kanser hücrelerindeki mutasyonlar ile inaktive edilmiştir. p53 'ün inaktive olması hücrenin sahip olduğu genomik anormalliklere rağmen intrinsik apoptozdan kaçınmasını sağlar. Aynı zamanda tümör hücresinde konvansiyonel tedavilere maruz kalarak oluşan DNA hasarına yanıt olarak apoptozun başlatılması basamağı gerçekleşmez. Bu yüzden kanser hücrelerinde apoptozu düzenleyen tedaviler umut vaat etmekte olup pek çok prelinik ilaç araştırmasının odağı haline gelmiştir.

Apoptotik hücre ölümüne yol açan iki sinyal yolağı mevcuttur. Birincisi intrinsik yolak olup, Bcl-2 protein ailesi ve mitokondriyal sinyaller ile aktive olur. İkincisi hücre yüzeyindeki spesifik ölüm reseptörlerinin (DRs) proapoptotik ligandları ile etkileşmesiyle uyarılan ekstrinsik yolaktır. Her iki yolak enzimatik kaspaz sistemini uyarıp apoptotik hücre ölümüne yol açar. DNA hasarı, hücre iskeletinin hasarı gibi ciddi hücre streslerinde intrinsik apoptotik mekanizma uyarılır. Proapoptotik Bcl-2 ailesinin üyesi olan BH3 proteinin transkripsiyonu yoluyla sağlanır. DNA hasarı ile p53'ün aktive olması BH3 proteinlerinden PUMA ve NOXA'nın transkripsiyonunu uyarır. Böylelikle BAX ve BAK aktivasyonu ile

apoptotik mekanizma uyarılmış olur. Sağlıklı hücrelerde antiapoptotik BCL-XL, proapoptotik proteinlere örneğin BAK ve BAX'a bağlanarak bunların aktivasyonunu engeller (106).

Kemoterapi ve radyoterapi p53 sistemini aktive ederek intrinsik apoptotik mekanizmayı uyarır. Proapoptotik membran reseptörlerinin uyarılması p53'ten bağımsız olarak ekstrinsik yolak ile apoptozu uyarır. Bu reseptörler seçici olarak normal hücreleri ayırıp tümör hücrelerinde apoptozu uyarırlar. Proapoptotik membran reseptör agonistlerinin kemoterapi ile kombine edilmesi sinerjistik antitümör etki gösterir. Aynı zamanda bu birliktelik kemoterapiye duyarlılığın yeniden düzenlenmesinde yeni bir tedavi seçeneği sağlamaktadır (104).

Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyelerinin fonksiyon yitirmesi ya da ekspresyonunun durmasının lösemi ve lenfomaya yol açtığı gösterilmiştir. Bcl-2 antiapoptotik proteinin aşırı ekspresyonu B hücreli lösemilerde ve bazı AML hastalarında gösterilmiştir. Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri lenfoma ve lösemi gelişiminde bu hastalıkların seyrinin ciddiyetinde ve tedaviye direncinde önemli rol oynar. Örneğin A1 proteini AML hücrelerinin yaşam süresi ile ilişkilidir. Mcl-1'in artmış olması lösemilerin relaps yapması ile ilişkili bulunmuştur. Bcl-XL'nin AML hastalarında artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Bcl-2 ve Bcl-XL tarafından PML-RAR α ve BCR-ABL'nin indüklendiği akut lösemilerin görülme sıklığı artmıştır.

Lösemik hücrelerde apoptozun indüksiyonunu etkileyen genetik ve mikroçevresel faktörlerle ilgili de çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sitotoksik ilaçlarla lösemik hücre dizilerinin tedavisinin sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Kaspazların aynı zamanda, taze izole edilmiş B kronik lenfositik lösemilerin sitotoksik tedavileri sonrasında aktive oldukları gösterilmiştir. Apoptozisin regüle edilememesi, hücre ölümünü regüle edici proteinleri kodlayan genlerin translokasyonlarından dolayı meydana gelir (8).

2.6. Wnt Sinyal Yolağı

Wnt geni, yaklaşık 27 yıl önce ilk olarak int-1 adı ile farenin tümörlü meme dokusundan klonlanmış olan bir gendir. Daha sonra, *Drosophila*'da bulunan "wingless" geninin int-1 geni ile dizi ve fonksiyon benzerliği gösterdiği saptanarak, 1991 yılında bu iki gen ismi birleştirilmiş ve bu gen literatüre Wnt geni olarak geçmiştir (107,108). Günümüze kadar insanda tanımlanmış olan Wnt gen ailesine ait birbirine temel yapı olarak benzeyen 19 adet protein vardır (109).

Wnt proteinlerinin hücre büyümesi, hücre adezyonu, hücre hareketi, hücre polaritesi ve farklılaşmasını düzenlediği bilindiği gibi ayrıca hem kök hücrelerinin özelleşmesinde ve değişimlerinde hem de pek çok dokunun embriyonik gelişiminde (özellikle merkezi sinir sistemi, böbrek, meme bezleri ve dokusu ve ekstremitelerde) önemli rol oynadıkları da gösterilmiştir (110).

Hem erken embriyolojik dönemde hem de çeşitli kanser türlerinde aktive olduğu bilinen Wnt sinyal ileti yolu son yıllarda kanser araştırmacıları tarafından oldukça dikkat çekmeye başlamıştır, çünkü bu sinyal yolağındaki birçok genin neoplastik transformasyona sebep olduğu bilinmektedir (109).

Temel olarak 3 çeşit Wnt sinyal yolağı tanımlanmıştır:

1. Wnt/ β -katenin (Kanonik/Klasik) sinyal yolağı
2. Wnt/Ca²⁺ (Kanonik olmayan) sinyal yolağı
3. Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) (Kanonik olmayan) sinyal yolağı

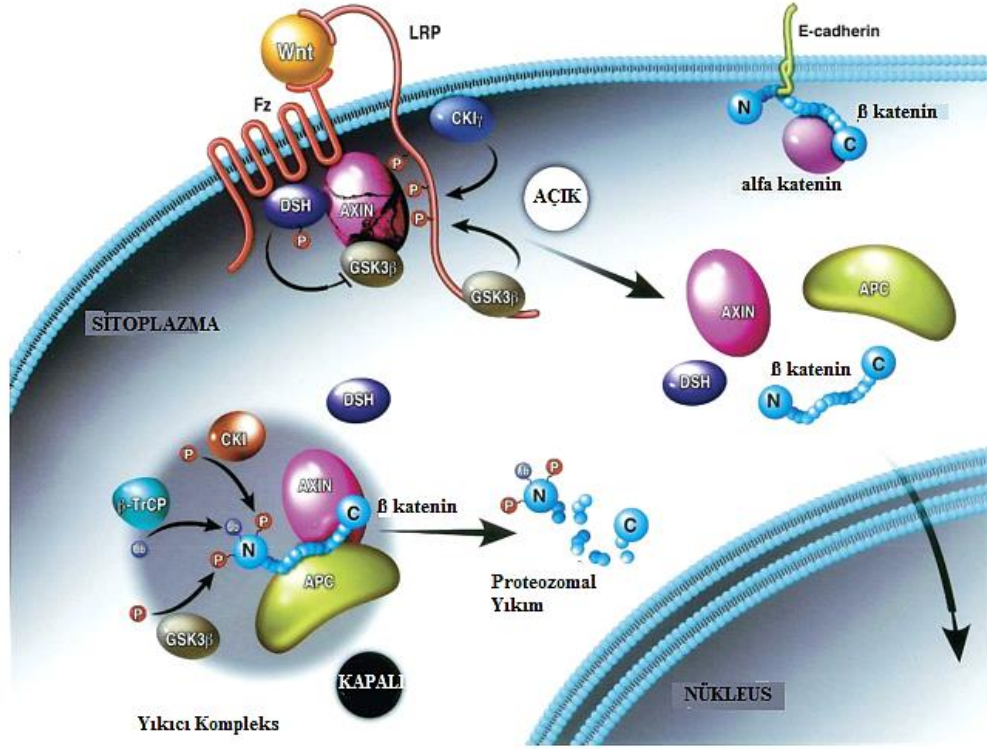
Kanonik olmayan yolakların kanser gelişimindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Ancak bunların, Wnt/ β -katenin sinyal yolağıının antagonisti gibi davrandığı düşünülebileceği gibi, başka bir fikre göre de Wnt'lerin aktivasyonunun bu iki yolak aracılığı ile tümör progresyonunu sağlayabileceği öngörülmektedir (109).

2.6.1. Wnt/ β -Katenin (Kanonik/Klasik) Yolağı

Kanser gelişiminde rol oynayan en temel yolaktır. Bu yolağın anlaşılmasında merkez rolü β -katenin (CTNNB1) oynar. Kanonikal Wnt yolağı kök hücreler için kritik düzenleyici sinyal yolağı olarak görülmektedir. Birçok dokuda da Wnt sinyal yolağının aktivasyonu kanserle ilişkili bulunmuştur. Bu drurumun muhtemelen kök ve progenitör hücrelerin, Wnt sinyal yolağı tarafından sıkı şekilde düzenlenen kendini yenileme özelliğinin kanser hücrelerinde değişmesi ve malignant çoğalmaya izin vermesiyle ilgili olduğu düşünülmektedir (11).

Wnt sinyal yolağında görev alan β -katenin proteini hücre içinde membrana bağlı olarak, sitozolde ve çekirdekte olmak üzere 3 farklı bölgede bulunabilir (111). Wnt/ β -katenin sinyal yolağında transkripsiyon faktörü olarak görev yaptığı ortaya konan (112) β -katenin, adheziv hücre-hücre bağlantılarında ve Wnt sinyal yolağında görevli çok fonksiyonlu bir proteindir (111, 113).

β -katenin sitoplazmada bulunur ve Wnt sinyal aktivasyonu ile çekirdeğe taşınır. Böylelikle çok sayıda genin transkripsiyonunu aktive eder. Aynı zamanda bu yolak çok sıkı bir şekilde kontrol edilir, ancak ihtiyaç duyulduğu zaman aktive olur (109). Bu yolağın en temel bileşenleri; multiprotein kompleksini (yıkım kompleksini) oluşturan Axin-APC (Adenomatous Polyposis Coli)- GSK3 β (Glikojen Sentez Kinaz 3 β) ve bu yıkım kompleksinin antagonistleri olan Dvl (Dishevelled)- CKI ϵ (Kazein kinazI ϵ)- GBP/Frat ve de β -katenin'dir (114).



Şekil 2.8. Wnt/β-katenin sinyal yolağının şematik gösterimi (115)

Wnt sinyal varlığında; Eğer hücre bir Wnt sinyali algırsa öncelikle Wnt sinyal proteini gelir, hedef hücre zarında bulunan Fz reseptörü ve LRP5/6 koreseptörü ile ilişki kurar. Bu bağlanma ile beraberinde Wnt 2 önemli fosforillenme reaksiyonunu uyarır. Bunlardan biri LRP5/6'nın sitozol içinde kalan kısmının GSK3β ve CKIε enzimleri tarafından fosforillenmesidir. Bu kısmın fosforillenmesi, sitozol içerisinde bulunan ve Axin-APC-GSK3β'dan oluşan yıkım kompleksini etkiler. Bu fosforillenmenin etkisi sonucu bu kompleksi bir arada tutan Axin ile ona bağlı bulunan GSK3β bu kompleksten ayrılarak, LRP5/6'nın sitozol içindeki fosforillenmiş kısmına bağlanır. Diğer bir fosforilleme işlevi ise, sitozolde bulunan CKI, CKII ve Par-1 enzimleri ile Dvl proteininin fosforillenmesidir. Dvl, Axin'e bağlanarak, Axin proteininde konformasyonel bir değişiklik meydana getirir. Bu değişiklik, GSK3β'nın Axin'den ayrılmasını sağlar. Axin'den ayrılan GSK3β, Frat-1 tarafından inhibe edilir. Bu sayede GSK3β'nın β-katenini fosforilleme etkisi ortadan kalkar ve hücre içinde "β-katenin" konsantrasyonu artar. Hücre içinde biriken bu "β-katenin" başlıca iki mekanizmayı tetikler. Bunlardan birincisinde, "β-katenin" hücre membranındaki N-kaderin'in hücre içi bölümüne bağlanarak, hücreler arası

bağlantıyı güçlendirici ve stabilize edici rol oynar. İkincisinde ise, hücre çekirdeği içine girerek "Tcf/Lef" transkripsiyon faktörlerine bağlanır ve Wnt sinyal yolunun hedef aldığı genlerin transkripsiyonlarına imkan sağlar (Şekil 2.8) (109).

Wnt sinyal yokluğunda; Wnt hücre zarındaki Fz ve LRP5/6 reseptörlerine bağlanamaz. Dolayısıyla sinyal mekanizmasının aktivasyonunda rol oynayan 2 fosforillenme işlemi gerçekleşemez. Fosforillenme reaksiyonları gerçekleşmediği için, yıkım kompleksi aktif durumdadır. Bu yıkım kompleksi üyeleri olan GSK-3 β ve beraberindeki "Axin" ve tümör baskılayıcı faktör olan "APC", " β -katenin" in fosforilasyonunu N-ucunda yer alan serin ve treonin amino asitlerinden (kodon 33, 37, 41) kazein kinaz-1 (CKI) ise Ser 45'den yapmaktadır. Bu fosfoaminoasitler β -katenine 2. bir protein kompleksi (ubikutin ligaz kompleksi) için bağlanma bölgesi oluştururlar ve ubikütinasyonu başlatırlar. Böylelikle β -TRCP (β -transducin repeat containing protein), proteozomal degradasyon için proteini hedefler ve β -kateninin degradasyonu sağlanır. " β -katenin" in degradasyonu da, hücre çekirdeğinde "Tcf/Lef" grubu transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanarak Wnt sinyal yolunun hedefi olan genlerin transkripsiyonlarını baskılamalarına imkan sağlar (Şekil 2.8) (109, 116).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi

Bu çalışmaya, Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'nun 13.10.2014 tarih ve 063 numaralı kararı ile etik kurul onayı alındıktan sonra başlandı. Çalışmamız için 2011-2014 yılları arasında Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim Araştırma Hastanesi Kemik İliği Nakil Ünitesinde tedavi görmüş, ALL tanısı konulmuş 8 hasta birey (2 T-ALL, 6 B-ALL) kontrol grubu için 6 sağlıklı birey seçilmiştir. Kök hücre işleme ve saklama laboratuvarı'nda standart dondurma protokolleri uygulanarak saklanan hasta ve sağlıklı bireylerin kemik iliği örnekleri kullanılmıştır.

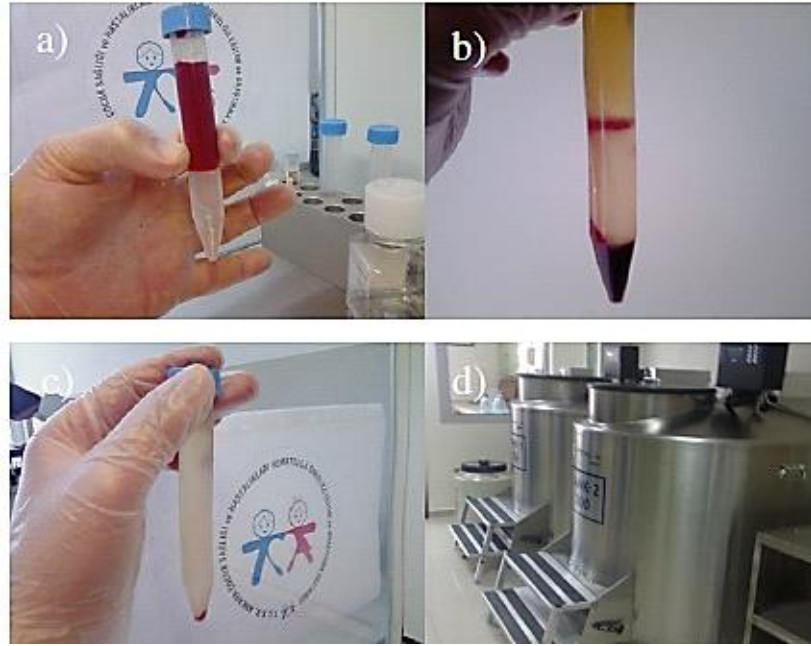
3.1.1. Numunelerin Toplanması

Kemik iliği nakil ünitesine (KİT) ALL tanısıyla yatan ya da hematoloji servisine ALL tanısı için gelen hastalardan herhangi bir tedavi uygulanmadan, tanı anında 2-4 ml kadar kemik iliği ve periferik kan örneği Kök Hücre İşleme ve Saklama laboratuvarına gönderilmiştir. Ayrıca nakil için KİT ünitesine yatan ALL hastalarının vericilerinden de ameliyathane ortamında steril şartlarda Krista iliaka posteriordan 500-1000 ml kadar toplanan kemik iliğinden 2-4 ml kadar alınıp çalışma için ayrılmıştır.

3.2. Mononükleer Hücrelerin Ayrılması

Gelen kemik iliği örneği 1:1 oranında PBS (Biochrom, Almanya) ile karıştırılarak 4 ml fikol (Biocoll, Biochrom, Almanya) üzerine yayılmıştır. Kemik iliği içerisindeki mononükleer hücreler (MNH) frensiz olarak 2200 rpm'de 20 dakika santrifüj (Eppendorf, Almanya) edilerek ayrılmıştır. Santrifüj sonunda oluşan MNH tabakası toplanarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. İçerisinde az sayıda olan MKH'leri de içeren tüm pellet homojenize edilerek 10 ml PBS ile sulandırılıp 2000 rpm'de 5

1 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Altta kalan pelletin üzerine 5 ml PBS eklenerek sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre sayısı otomatik hücre sayım cihazında sayılıp, elde edilen ml'deki hücre sayısı total sayıyı hesaplamak için 5 (5 ml olduğu için) ile çarpılır. Elde edilen hücreler bir kez daha santrifüj edilip pellet haline gelen hücreler üzerine Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose (DMEM-LG), %20 Fetal bovine serum ve %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) (OriGen, İsveç) içeren dondurma (freezing) solüsyonu eklenerek kriyoviallerde +4°'de 1 saat, 20°'de 4 saat, - 80°'de 24 saat ve daha sonra -196° sıvı azot tanklarına alınmıştır (şekil 3.3).



Sekil 3.1. Mononükleer hücrelerin ayrışması ve dondurulması. a) Mononükleer hücre ayrışması için fikol eklenmesi, b) Fikol eklenmiş örneğin santrifüj sonrası plazma, mononükleer hücre ve eritrositler olarak ayrışması, c) Ayrılmış mononükleer hücreler, d) Hücrelerin dondurulduğu -196 °C sıvı azot tankları.

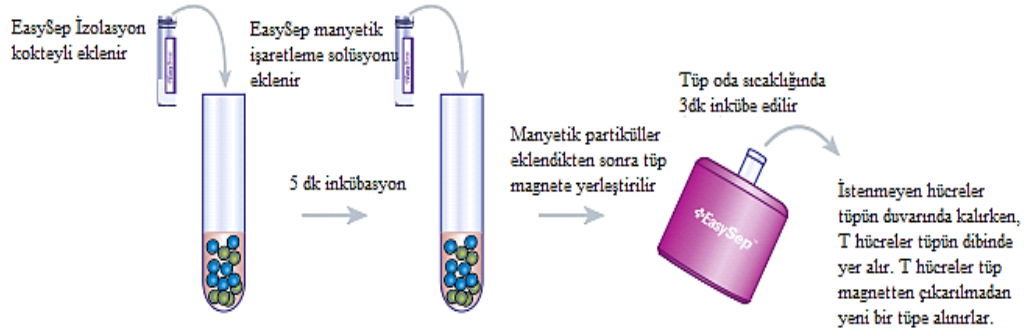
3.2.1. Örneklerin Çözülmesi

Kriyovialler azot tankından alındıktan sonra oda ısısında hızlıca çözülmüştür. Çözülen ürün yeni bir tüpe alınarak freezing solüsyonunu ortamdaki uzaklaştırmak için 5ml PBS eklenip 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine kültür

solüsyonu eklenerek doku kültür kabına (25 cm²'lik flask-T25) 5 ml büyüme besiyeri [DMEM-LG (Biochrom, Almanya), %10 fetal bovine serum (Biochrom, Almanya), %1 antibiyotik (Penisilin-Streptomisin, Biochrom, Almanya)] ile birlikte aktarılmış ve 37⁰C, %5 CO₂'li inkübatörde (Galaxy 170R, Eppendorf Company, Almanya) kültüre edilmiştir.

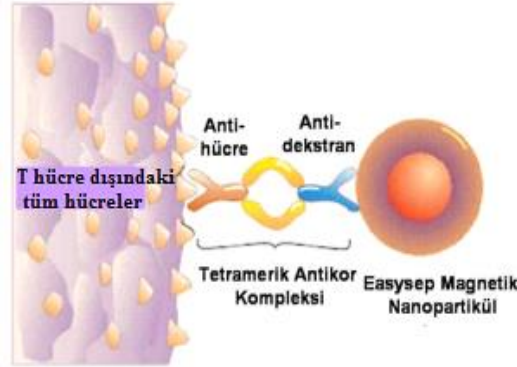
3.3. Mononükleer Hücrelerden Blastik T Hücre İzolasyonu

Aynı hasta bireyin en az iki kriyoviyalde dondurulmuş MNH örneklerinden biri ekim için kullanılmış, diğeri ise T hücre izolasyonu için kullanılmıştır. B-ALL'li hasta MNH örnekleri için B hücre izolasyonu yapılmamış olup direk MNH' ler kültüre edilmişlerdir. MNH'lerden T hücrelerin eldesi için EasySep™ T Hücre izolasyon kiti (Stem cell, Kanada) kullanılmıştır. Bu kit, T hücrelerin ayırımında kullanılmak üzere "EasySep™ İnsan T Hücre izolasyon kokteyli (Stem cell, Kanada)" ve manyetik işaretleme için "EasySep™ Dekstran Rapid Spheres (Stem cell, Kanada)" içerir. Mononükleer hücreler öncelikle izolasyon kokteyl ile karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında manyetik dekstran rapid spheres tüp içerisine ilave edilerek medyum ile tüp içerisindeki volüm 2.5 ml'ye tamamlandı ve tüp magnet içerisine yerleştirilerek 3 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda tüp magnetin içerisinde iken magnet ters çevrilerek nanopartiküller ile işaretlenmemiş T hücreler yeni bir tüpe alındı. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Negatif seleksiyon sonrası tüpün dibinde kalan örnekler yeni tüpe ilave edildi. T hücreler üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek, yaklaşık 250µl örnek hücre sayımı için hemogram cihazında (Beckman Coulter HmX-AL) okutuldu ve hücre sayısına göre 1:1 oranında ekim yapacağımız MKH'ler üzerine çoğunluğunu blastik hücrelerin oluşturduğu süspanse haldeki hücreler eklendi.



Şekil 3.2. EasySep™ T Hücre izolasyonu kiti ve magnetiyle T hücre izolasyonu

Negatif seleksiyon yaptığımız için hücreler, Tetramerik Antikor Kompleksi (TAC) kullanılarak dekstran kaplı manyetik nanopartiküller ile spesifik olarak işaretlenmiştir. Bu kompleks hem dekstran hem de hedef hücre yüzey antijenini tanıyabilir ve istemediğimiz tüm hücrelere bu partiküller yapışarak magnetin etkisiyle tüpün duvarına yapışır ve tüpün dibinde sadece T hücrelerinin olduğu karışımın oluşmasını sağlar.



Şekil 3.3. Tetramerik Antikor Kompleksi

3.3.1. İzole Edilen Blastik T hücrelerin Flow Sitometrik Analizleri

İzole edilen blastik T hücre popülasyonlarının sayımı hemogram cihazıyla yapıldı ve karakteristik özelliklerini belirlemek amacıyla flow sitometride immunfenotipleme yapıldı. Hücre yüzeyinde ekspres olan antijen moleküllerine spesifik antikorlar kullanılarak tanımlama yapılmaktadır. Antikor aracılığı ile antijeni göstermek için kullanılan florokromlar ışığı absorbe ederek farklı dalga boylarında

ışın saçarlar. Farklı florokromların ışığı aktiveleme (eksitasyon) ve emilimleri (emisyon) farklıdır. T hücreler için kullanılan primer antikorlar (Beckmann Coulter, CA, ABD) ve konjuge florokromları tabloda gösterildiği gibidir.

Klonal bir hastalık akut lösemide olgun hale gelemeden kontrolsüz çoğalma özelliği kazanan blastik hücreler farklı klonlardan gelişmiş olabilir. Süspansiyon halindeki hücre popülasyonunda grafik bir çerçeve ile kapılama işlemi yapıldı. FSC/SSC ve CD45 grafiğinde T hücrelerinin düştüğü yerler belirlendi.

Tablo 3.1. Antikor-Konjuge Florokromların eksitasyon ve emilim değerleri

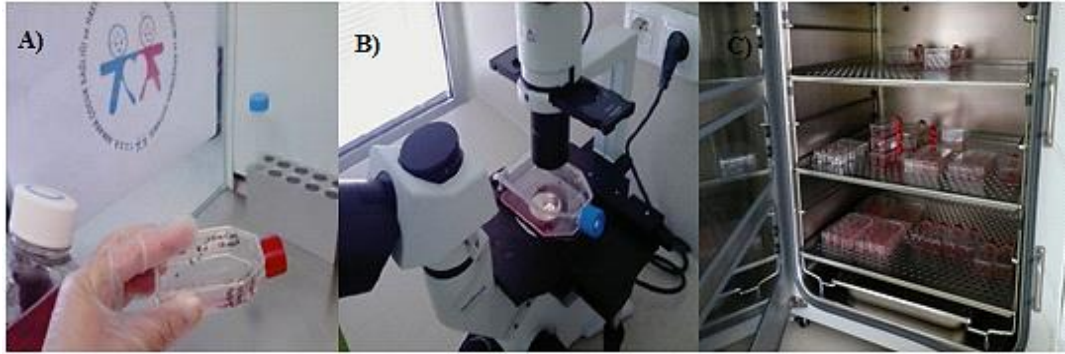
Antikor - Konjuge Florokrom	Eksitasyon	Emilim
CD8-FITC (Fluorescein isothiocyanate)	468-505	504-541
CD3-PC7 (Fikoeritrin siyanin7)	486-580	660-680
CD4-PC5 (Fikoeritrin siyanin5)	486-580	675-770
CD7-ECD (Fikoeritrin-Teksas Kırmızı1-x)	486-575	610-635
CD45-APC (Allofikosiyanin)	633-635	650-680

3.4. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Hücre Kültüründe Çoğaltılması

3.4.1. Mononükleer Hücrelerden MKH Kültürüne Geçiş

Önceden MNH ayrımı yapılmış ve dondurulmuş örnekler çözülerek pasaj 0'da 25 cm²'lik flaslara (T25) ekilmiş ve 24 saat sonunda gözlenmiştir. Kültür flaskı tabanına yapışan adeziv hücreler gözlendikten sonra her 3 günde bir kültür besiyeri değiştirilmiştir. Buradaki amaç adeziv olmayan hematopoetik hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Yaklaşık iki hafta içerisinde adeziv karakterdeki hücrelerin çoğalarak kültür kabını %90-100 oranında doldurması sağlanmıştır. Konfluent hale gelen hücreler pasaj 2 'ye geçirilmek üzere, öncelikle hücre kültür ortamından besiyeri uzaklaştırılır sonra ortama PBS eklenerek hücreler yıkanır. Ortamdan PBS uzaklaştırılarak 4 ml %0,05 tripsin/EDTA (Biochrom, Almanya)

konularak inkübatöre konularak 10 dk beklenir. Bu aşamada hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları invert mikroskopta kontrol edildikten sonra kalkmış olan tüm hücreler kültür flasklarından alınır. Falcon tüpe toplanan örneğe tripsinin etkisini elimine etmek için PBS eklenir ve sayım için 300µl örnek alınarak otomatik sayım cihazında (Beckman Coulter HmX-AL) sayılır. Falcon tüpte kalan hücreler 2000 rpm’ de 15 dk santrifüj edilir. Sayım sonucuna göre pasaj 1 ‘e geçecek hücreler tekrar ekim için hazırlanır.



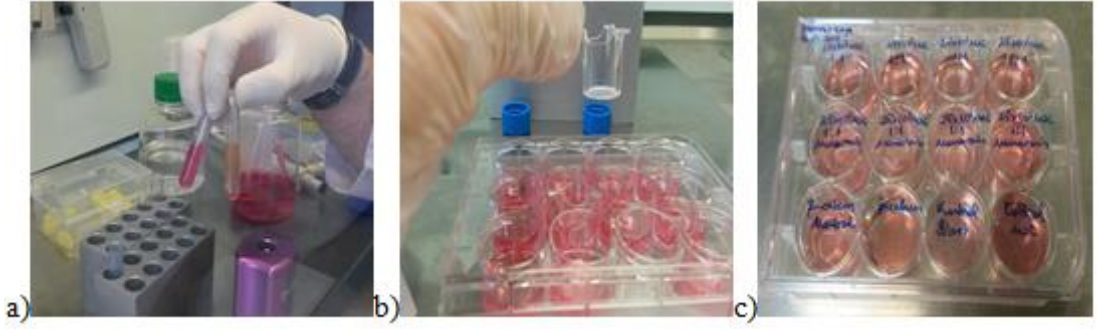
Şekil 3.4. A) Mononükleer hücrelerin T25' lik hücre kültür flaskına ekimi, B) İnvirt mikroskopta incelenmesi C) 37° C, % 5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmesi.

3.4.1.1. MKH Kültüründe Pasajlamalar

Pasaj 0 sonunda hücre sayımının sonucuna göre bir T25 kültür flaskına 5×10^4 hücre olacak şekilde 5ml hücre kültür besiyeri eklenerek ekilir ve 37°C, %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirilir. Kalan hücreler üzerine DMEM-LG, %20 fetal bovine serum ve %10 DMSO (OriGen, İsveç) içeren dondurma (freezing) solüsyonu eklenerek kriyoviallerde +4°'de 1 saat, -20°'de 4 saat, -80°'de 24 saat ve daha sonra -196° sıvı azot tanklarına alınmıştır. Aynı işlem pasaj 2'ye geçilirken tekrarlanmıştır. Pasaj 1 sonunda elde edilen hücrelerin bir kısmı MKH karakterizasyon çalışmasına, bir kısmı da her kuyucukta 25×10^3 hücre olacak şekilde blastlarla kokültür için 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi.

3.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Blastlarla Kokültürü

Pasaj 2’de 12 kuyucuklu kültür kaplarına (Cellstar, Greiner Bio-One) 25×10^3 MKH ekimi yapılmış ve MKH’ler yaklaşık 5 günde %80 çoğalma kapasitesine ulaşmışlardır. 12 kuyucuklu kültür kabının zeminine yapışan MKH’ler blastik hücrelerle kokültüre edilmiştir. Küçük lenfositler yaklaşık 7-10 μ m iken büyük lenfositlerin boyutları 14-20 μ m’ye kadar çıkabilmektedir. Kokültür için hücre hücre temasını engelleyecek şekilde por büyüklüğü 1 μ m olan ve 12 kuyucuklu kültür kaplarına uygun, kolaylıkla takıp çıkarılabilen membranlar kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Mezenkimal kök hücrelerin blastik hücrelerle kokültürü. a) EasySep™ T Hücre izolasyon kiti ve magneti ile izolasyon b) ThinCert™ hücre kültürü membranı, c) 12 kuyucuklu kültür kabında kokültür.

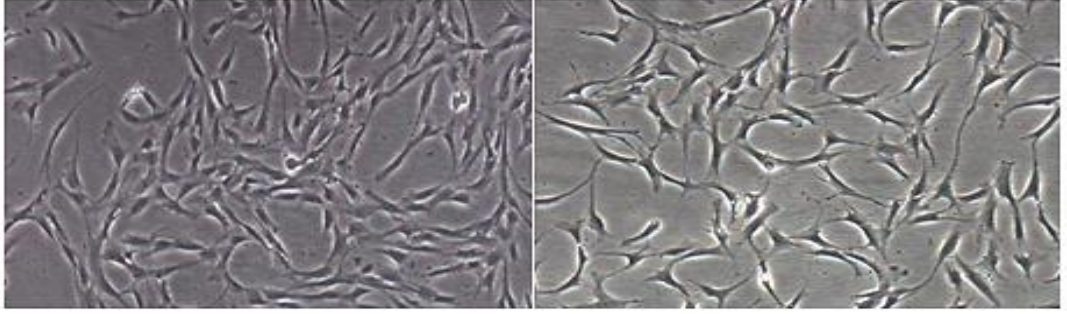
Kokültür çalışmaları iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bir grup, 12 kuyucuklu kültür kabının kuyucuklarında hücre hücre teması olacak şekilde, ALL’li hastalardan izole edilen, çoğunu (%70-95) blastik hücrelerin oluşturduğu hücre süspansiyonu ile direk 1:1 oranında MKH’lerle kokültüre edilmiştir. Diğer grup ise kokültür çalışmaları için özel ThinCert™ hücre kültürü membranları (Greiner Bio-One, Avusturya) kullanılarak ve hücre hücre teması engellenerek yine 1:1 oranında blastik hücreler MKH’lerle kokültüre edilmiştir. Ayrıca negatif kontrol olarak sadece blastik hücreler ve sadece mezenkimal kök hücreler kültüre edilmiştir. İki kuyucuk ise β -katenin immunositokimya çalışması için ayrılmıştır (Şekil 3.5.c).

3.6. MKH'lerin Karakterizasyonu

Tüm karakterizasyon çalışmaları pasaj 2 MKH'ler ile yapılmıştır.

3.6.1. Morfolojik Analiz

MKH'lerin karakterizasyonunda ilk adım hücrelerin plastik yüzeye yapışabilmeleri ve iğsi-poligonal morfoloji göstermeleridir. Bu özelliklerinin saptanması inverted mikroskop kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Mezenkimal kök hücrelerin morfolojik görünümleri (invert mikroskop 4x).

3.6.2. Farklılaşma Testleri

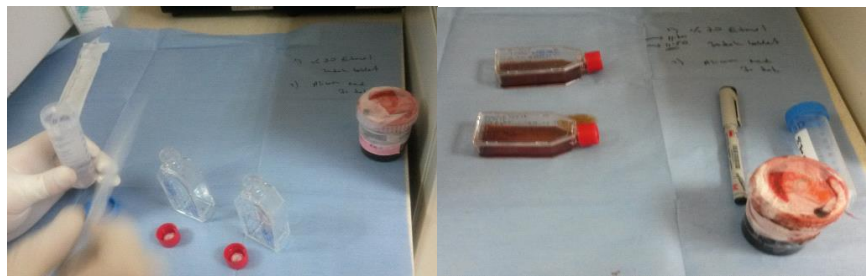
Hücrelerin MKH olduğunun kanıtlanması için, en azından, adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitesi olduğunun in-vitro ortamda gösterilmesi gerekmektedir. Bu nedenle MKH'ler adipojenik veya osteojenik yönde farklılaşmayı uyaran besiyeri ortamında tutularak 3 hafta sonra farklılaşma gösterip göstermedikleri yönünden değerlendirilmiştir.

Adipojenik Farklılaşma

İkinci pasajda olan hücreler T25'lik flasklara ekilerek çoğaltılmaya başlanmıştır. Haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek hücrelerin %100 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. Ardından flask 5 ml PBS ile yıkanmış ve adipojenik farklılaşması için 2 ml adipojenik farklılaşma besiyeri (MesenCult® Adipogenic stimulatory supplements (Human), Stemcell, Kanada) eklenmiştir. Üç günde bir kültür ortamı tazelenmiştir. Üç hafta sonunda flasklardaki besiyerleri toplanmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından yağ hücrelerine farklılaşan hücreler 5 ml %10 formol (Sigma, ABD) ile 1 saat fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından formol uzaklaştırılıp, steril distile su ile yıkanmıştır. Ardından 5 ml %70'lik izopropronalol konularak 5 dakika bekletilmiştir. İzopropronalolun uzaklaştırılmasından flaska 5ml Oil Red O boyası (Sigma, ABD) eklenerek 5 dakika oda ısısında beklenmiş ve ardından distile su ile 2 kere yıkama yapılmıştır. Flaska 5 ml hematoksilen boyası eklenerek 1 dakika oda ısısında tutulmuş, çekirdek boyanması sağlanmıştır. Hematoksilen ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra ortamın kurumaması amacı ile 5 ml distile su eklenmiştir. Dijital görüntüleme sistemi (Olympus, Japonya) ile fotoğrafları çekilmiştir. Oil red boyası ile kırmızı renkte boyanma ve hücre içerisinde yağ damlacıkları görülmesi adiposit farklılaşmasının kanıtı olarak kabul edilmiştir.

Osteojenik Farklılaşma

Tripsinize edilmiş olan pasaj 2 MKH'ler flaska ekilerek çoğaltılmış ve haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek hücrelerin %90 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. Ardından flasklar 5 ml PBS ile yıkanmış ve kemik hücrelerine farklılaşması için 5 ml osteojenik farklılaşma besiyeri (MesenCult® Osteogenic Stimulatory Kit, Stemcell, Kanada) eklenmiştir. 3 hafta sonunda flasklardan besiyerleri toplanmış ve 5 ml PBS ile yıkama yapılmıştır.

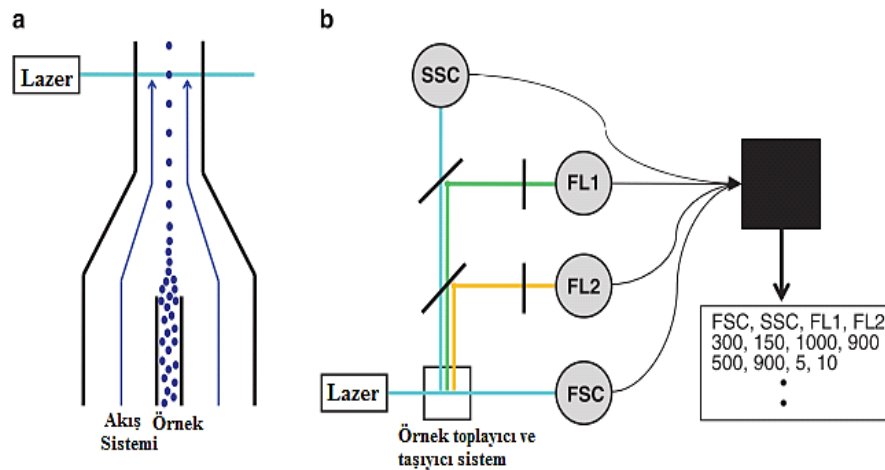


Şekil 3.7. MKH'lerin osteojenik farklılaşma aşamaları

Farklılaşma analizi için 5 ml %4 paraformaldehit ile 30 dakika oda ısısında fikse edilen hücreler distile su ile yıkanarak paraformaldehit ortamdan uzaklaştırılmıştır. Flasklara 5 ml Alizarin Red boyası (Sigma, ABD) eklenerek 20 dakika oda ısısında bekletilmişlerdir. Ardından boya uzaklaştırılıp flasklar 5 ml distile su ile yıkanmış ve dijital görüntüleme sistemi ile flaskların fotoğrafları çekilmiştir. Alizarin red boyası ile koyu renkte kalsiyum depozitleri görülmesi osteojenik farklılaşmanın kanıtı olarak kabul edilmiştir.

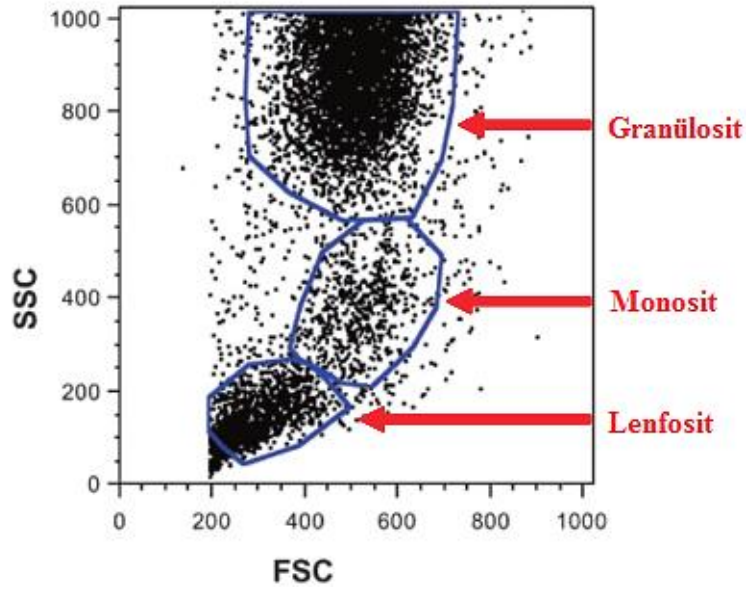
3.7. Flow (Akım) Sitometri (FCM) ile Apoptoz Tayini

Flow sitometrinin temel prensibi, bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküllerin lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilerek hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyallerin toplanarak analiz edilmesidir. Oluşan sinyallerin kaynağı hücrenin büyüklüğü, granülaritesi gibi fiziksel özellikleri yanında hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilmektedir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir.



Şekil 3.8. Flow sitometri cihazının şematik gösterimi (117)

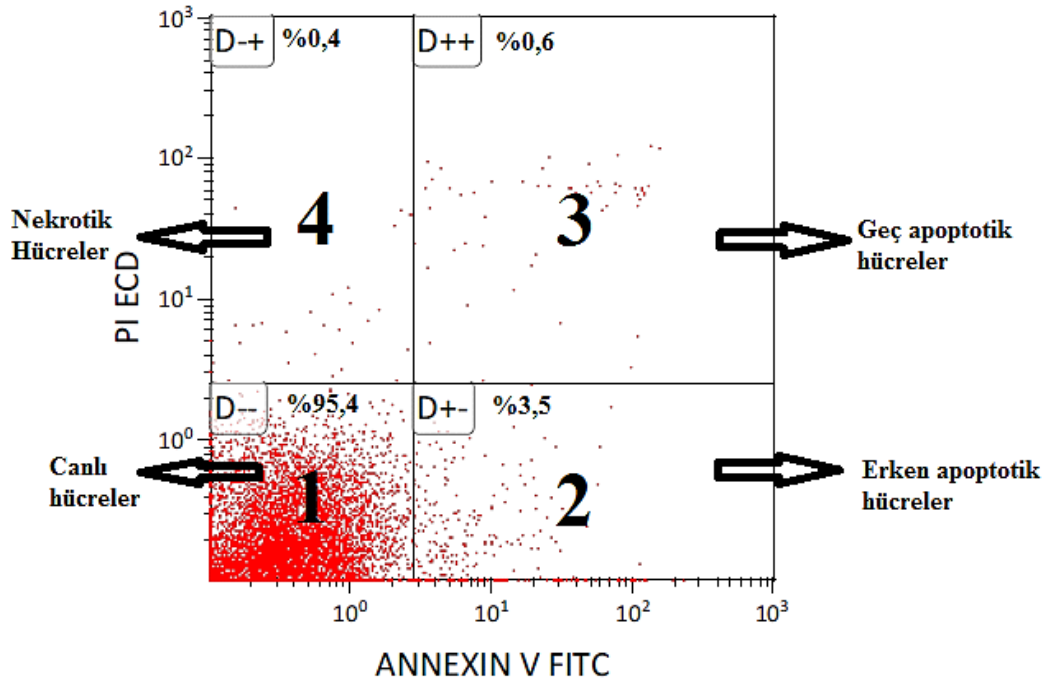
Flow sitometri birçok sistemi birleşmesinden oluşmuştur. Bunlar örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi, ışık (lazer) kaynağı, sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklanma aynaları, sinyal dedektörleri (optik ve elektrik sinyal), bilgisayar sistemi ve ayırma mekanizmasıdır. Süspansiyon halindeki işaretli hücreler ve partiküller hava basıncı ile akış sistemi içinden geçirilir. Bu sistemde akış hızı yüksek olduğundan hücreler basıncın etkisiyle akış kabine gelir. Buradan hücrelerin tek sıra halinde geçişi sağlanır ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler. Lazer kaynağı olarak; argon iyonu, kripton, helyum-kadmiyum, helyum-neon gibi yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları kullanılır. Yapısında yer alan sinyal dedektörleri: önden saçılımı sağlayan ve hücre boyutunu gösteren Forward Scatter (FSC), yandan saçılımı sağlayan ve hücrenin iç yapısını granülatesini gösteren Side Scatter (SSC)'dir. FSC/SSC grafiği ile hücre süspansiyonundaki farklı popülasyonlar birbirinden ayrılabilir. Örneğin; periferik kanda lenfositler daha küçüktür ve az granülarite gösterirler, monositler orta büyüklükte ve orta granülarite gösterirken, granülositler hem büyüktürler, hem de dahafazla granülariteye sahiptirler (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Flow sitometri çalışmaları için kemik iliği ve periferik kandan kapılama stratejileri (117)

Apoptozis de genetik olarak kontrol edilen, hücrenin kendisini öldürmeye karar verdiği ve bunun için çok sayıda protein sentezlerine yöneldiği aktif ve

dinamik bir olaydır. Flow sitometri ile henüz hücrelerde nükleer değişiklikler oluşmadan membrandaki erken değişiklikler sırasında bile apoptozis ölçülebilmektedir. Apoptozis geliştiğinde hücre membranının normalde iç kısmında bulunan fakat apoptozis ile hücre yüzeyine çıkan fosfatidilserine bağlanma özelliği gösteren Annexin V ile hücrelerde apoptozis tayini yapılabilmektedir. Ölü-canlı hücre ayırımı içinde ise hücrelerin eş zamanlı olarak PI ile boyanması sonuçları daha güvenilir hale getirmektedir. Bilgisayar programı ile analiz edilen hücreler FSC/ SSC grafiğinde belli alanlara düşerler. Bu alanlardan incelenecek hücrelerin yeri belirlenerek kapılama yapılır. Apoptozis tayininde de bu grafiğin 4 bölgesine düşen hücrelerin her birisi farklı özellikteki hücreleri gösterir. Analiz sonucunda canlı hücreler Annexin V (-)/PI (-), erken apoptotik hücreler Annexin V (+) /PI (-), geç apoptotik hücreler Annexin V (+) /PI(+), nekrotik hücreler ise Annexin V (-) /PI (+) ekspresyonu ile tayin edilir.



Şekil 3.10. Flow sitometride apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi. Grafikte 1 numaralı bölge canlı hücreleri, 2 numaralı bölge erken apoptotik hücreleri, 3 numaralı bölge geç apoptotik hücreleri ve 4 numaralı bölge nekrotik hücreleri gösterir.

Çalışmamızda MKH'lerin blastik hücre popülasyonları üzerinde apoptotik etkisi olup olmadığını görmek için flow sitometri ile apoptozis tayini yapıldı. Bunun

için Annexin V-FITC/PI (Beckmann Coulter, Fransa) apoptozis kiti kullanıldı. 96 saat kokültüre edilen örneklerin membransız olan kuyucuklarında yüzeye yapışmamış medyum içinde yüzen blastik hücre popülasyonları toplandı. Membranlı kuyucuklarda ise direk membran üzerinde blastik hücre popülasyonları flow sitometri cihazına uygun toplama tüplerine alındı. Apoptozis tayini için tüm adımlar buz üzerinde çalışıldı. Tüpe alınan hücreler soğuk PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkandıktan sonra 4°C’de, 1500 rpm’ de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Ardından kit içerisinde yer alan ve çalışma öncesi hazır hale getirilen 1x bağlayıcı tampon çözelti (binding buffer) eklendi, süspanse edildi. 1µl Annexin V- FITC ve 5 µl PI eklendikten sonra iyice karıştırıldı ve buz üzerinde 15 dk karanlıkta inkübe edildi. 400µl bağlayıcı tampon çözelti eklenip homojen bir karışım elde edildikten sonra da 30 dk içerisinde örnekler flow sitometri cihazında (Navios-Beckmann Coulter, CA, ABD) değerlendirilmiştir.

MKH’ler üzerinde yüzen ya da membran üzerinde yer alan blastik hücreler toplandıktan sonra hücre kültür kabına yapışık olan MKH’ler üzerinden süpernatantları alınıp dondurularak saklandı. Yüzeyde yer alan MKH’ler ise tripsinizasyon işleminin ardından kaldırılarak kriyoviyallerde dondurularak saklandı. Dondurma işlemi öncesi kaldırılan MKH’lerin hemogram cihazında sayımı yapıldı.

3.8. İmmunositokimya

Hücre içinde bulunan bazı enzimlerin ya da makromoleküllerin lokalizasyonlarını incelemeye yardımcı olan immunositokimya yönteminde sistem, incelenecek olan bir makromoleküle karşı geliştirilmiş antikoru ortaya konulmasıdır. Spesifik antijen-antikor ilişkilerinden yararlanılarak moleküllerin hücre içindeki yerlerinin belirlenmesi ve görülebilir hale gelmesi amaçlanmaktadır. Bu anlamda Wnt sinyal yolağının anahtar düzenleyicilerinden biri olan β -katenin’in hücre içerisindeki yerinin ve sinyal yolağının hasta ve sağlıklı bireylerde aktivasyonunun farklı olup olmadığının belirlenmesi için monoklonal Anti β -katenin antikoru (E247, Abcam, Cambridge, MA, ABD) kullanılmıştır.

Wnt sinyal yolağının hem ALL ile bağlantılı hem de apoptozla ilgili proteinlerinden β -katenin'in blastik T ve B hücrelerdeki lokalizasyonlarının ve ekspresyon derecelerinin immunositokimya ile de gösterilerek flow sitometrik sonuçların desteklenmesi amaçlanmıştır. Ancak kullanılan örneğin hasta örneği olması ve hücre sayısının yeterince fazla olmamasından dolayı β -katenin blastik hücrelerde çalışılmamıştır. Bunun yerine blastik hücre popülasyonu üzerinde etkisi olduğunu düşündüğümüz MKH'ler de bu proteinin ekspresyon seviyeleri arasında fark olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bunun için daha önce blastik hücrelerle kokültüre edilen ve immunositokimya için saklanan MKH örnekleri 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. İmmun boyama ve mikroskopta inceleme kolaylığı açısından her kuyucuğa tabanı kaplayacak şekilde lameller yerleştirildi ve hücrelerin bu lameller üzerinde çoğalması sağlandı. 7 günde %70-80 oranında çoğalan hücreler %4'lük formaldehit ile 10 dk fikse edildi. Fiksasyonun ardından %1 BSA (Bovine Serum Albumin) %0.1 Tween, 0.3 M glisin ve %10 FBS içeren PBS ile oda sıcaklığında 2 saat bekletilerek bloklama yapıldı. Primer antikor %1 BSA ve %0.1 Tween içeren PBS ile 1/50 oranında dilue edildi. Bloklamanın ardından primer antikor eklenerek 4°C' de bir gece inkübasyon yapıldı. Ertesi gün 3 kere PBS ile yıkama yapılarak sekonder antikor (poliklonal, Anti-Rabbit IgG H&L (HRP); Abcam, MA, ABD) eklendi ve antikorla 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor da PBS ile yıkandıktan sonra DAB (3,3'-diaminobenzidine) ile boyama yapıldı. DAB substrat kitinde (Abcam, Cambridge, MA, ABD) yer alan DAB kromojen ve DAB substrat karışımı hazırlandı ve lamel üzerinde belirli alanlar DAB ile boyanarak mikroskopta incelendi.

Ayrıca MKH'lerde, apoptozis tayininde kullanılan Bax, Bcl-2 ve Kaspaz 3 (Abcam, Cambridge, MA, ABD) enzimleri çalışıldı. Apoptozis için β -katenin ile eş zamanlı aynı hücrede göstermek istediğimiz enzimler anti-rabbit antikorlar olduğu için çiftli boyama yapılamadı. Aynı hasta ve sağlıklı bireylerin örnekleri bu üç enzimle de ayrı ayrı boyandı. Antikorlar 1/50 oranında dilue edilerek boyama yapıldı. Önce primer antikorla bir gece inkübe edilen hücreler PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikorla inkübe edildi. Sekonder antikor sonrası DAB ile boyama yapılmış ve boyanan hücreler hem ışık mikroskobunda (Olympus, Japonya) hem de invert mikroskopta (Olympus, Japonya) görüntülenmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) ve MS-Excel 2007 programları kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Araştırmada yer alan değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilks testi ile değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistiklerinin gösteriminde ortanca (minimum-maksimum) değerleri kullanıldı. Ek bilgi olarak ortalama±standart sapma değerleri verildi. Belirtilen faktörlere ait gruplarda farklılığın incelenmesi amacıyla Mann-Whitney U testi ve Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizlerinden uygun olan yöntem kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarının Özellikleri

Çalışmamızda Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim Araştırma Hastanesi Kemik İliği Nakil Ünitesinde ya da Hematoloji Kliniğinde tedavi görmüş, ALL tanısı konulmuş 8 (%57.1) hasta birey ve transplantasyon için kemik iliği örnekleri saklanmış olan 6 (% 42.9) sağlıklı bireyin örnekleri kullanılmıştır. Kök Hücre İşleme ve Saklama Laboratuvarı'nda standart dondurma protokolleri uygulanarak saklanan hasta ve sağlıklı bireylerin kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Cinsiyet farkı gözetmeksizin 2-16 yaş aralığında bulunan hasta bireyler ile sağlıklı bireylerin kemik iliği örnekleriyle çalışılmıştır. Hasta bireylerin % 75.0' i (n= 6), sağlıklı bireylerin ise % 33.3' ü (n= 2) erkektir. Gruplarda ve cinsiyetlerde yaş dağılımı benzerdir (sırasıyla, $z= 0.980$; $p=0.345$ ve $z= 0.131$; $p=0.950$). Hastalara ait yaş ortancası 8 (min= 4; mak=16) yıl, sağlıklılara ait yaş ortancası 14 (min= 3; mak= 18) yıl olarak elde edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Grup ve cinsiyete göre yaş değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler

	Yaş				z	P
	n	min; mak	Ortanca	Ort±SS		
Grup						
Hasta	8	4; 16	8	9.6±4.5	0.980	0.345
Sağlıklı	6	3; 18	14	12.3±5.8		

Cinsiyet						
Erkek	8	3; 17	11	10.6±5.3	0.131	0.950
Kadın	6	4; 18	11	11.0±5.2		

4.2. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu, Üretilmesi ve Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

4.2.1. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Çoğaltılması

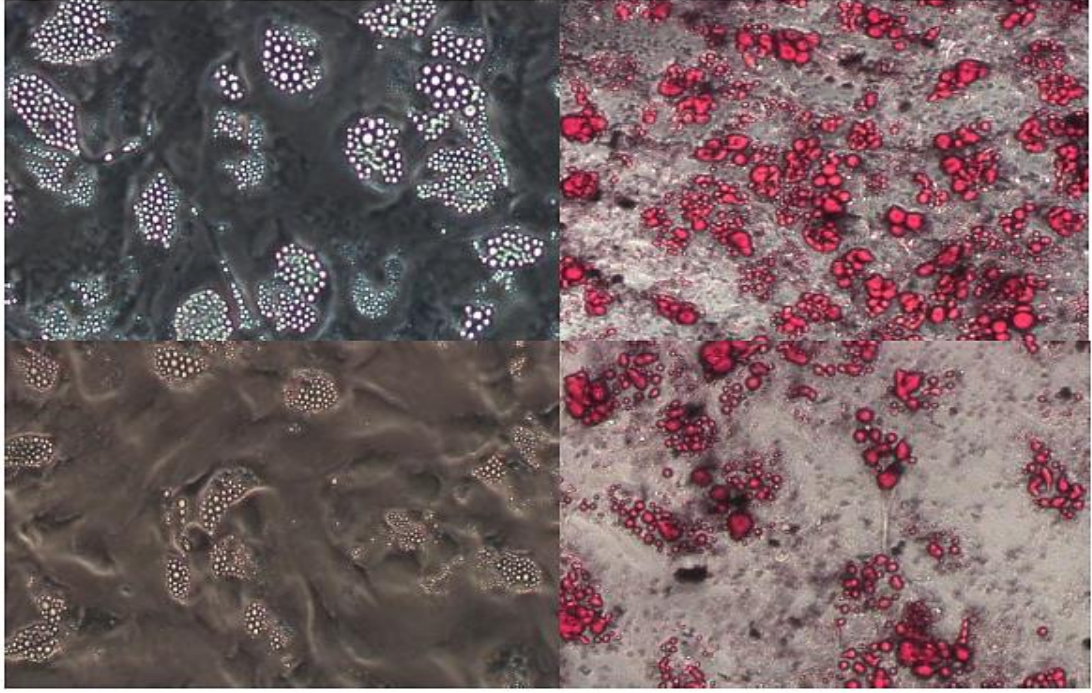
Mezenkimal kök hücreler birçok dokunun yanı sıra kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerle birlikte bulunmaktadır. Kemik iliğinde yer alan 100.000 çekirdekli hücreye karşın yaklaşık 1 MKH olduğu bildirilmektedir (118). Çalışmamızda da kültür ortamına bırakılan hücreler tek tek kültür kabına yapışmışlardır. Yapışan ve koloni formunda çoğalan fibroblast morfolojisindeki hücrelerin stromal kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden zengin olduğu; buna karşın yapışma göstermeyen hücrelerin ağırlıklı olarak hematopoetik hücreler olduğu bilindiğinden dolayı yapışmayan, besiyerinde yüzen hematopoetik hücreler üç günde bir besiyeri tazelenerek elimine edilmiştir. Doku kültür kabına yapışan hücrelerin 14 gün sonunda %80 oranında kültür kabının yüzeyini kapladığı gözlenmiştir. Tripsin enzimi uygulayarak yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlanan hücreler toplanmış ve bir kısmı daha sonraki çalışmalar için dondurularak -196 derecede sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Kalan hücreler ise tekrar kültür edilmiştir. Hücrelerin pasajlanma işlemi 2 kez uygulanarak MKH'lerin sayıca çoğalması ve daha homojen hücre popülasyonu elde edilmesi sağlanmıştır.

4.2.2. İnsan Kemik İliğinden İzole Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İzole edilen ve çoğaltılan hücrelerin MKH olduğunu kanıtlamak amacıyla karakterize edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin (ISCT/The International Society for Cellular Therapy) MKH'lerin karakterizasyonu için belirlediği kriterler kullanılmıştır (119). Bu tanımlamaya göre hücrelerin adezif (yapışan) yapıda olması, stromaya özgü yüzey belirteçlerine sahip olması, hematopoetik hücrelere özgü belirteçleri taşıması, adipojenik ve osteojenik olmak üzere en az iki hücre serisine multipotent farklılaşma özelliği göstermeleri ile MKH olarak adlandırılabilirler. Kemik iliğinden izole edilen mononükleer hücrelerinin kültürü sonucunda doku kültür kabının tabanına hücreler yapışmış ve çoğaltılarak pasajlama yapılmıştır. Böylece bu hücrelerin MKH olması için ilk koşul olan plastik yüzeylere yapışabilme özellikleri sağlanmıştır. Mezenkimal kök hücreler mezodermal germ tabakasına ait hücrelere farklılaşma özelliğine sahip hücrelerdir.

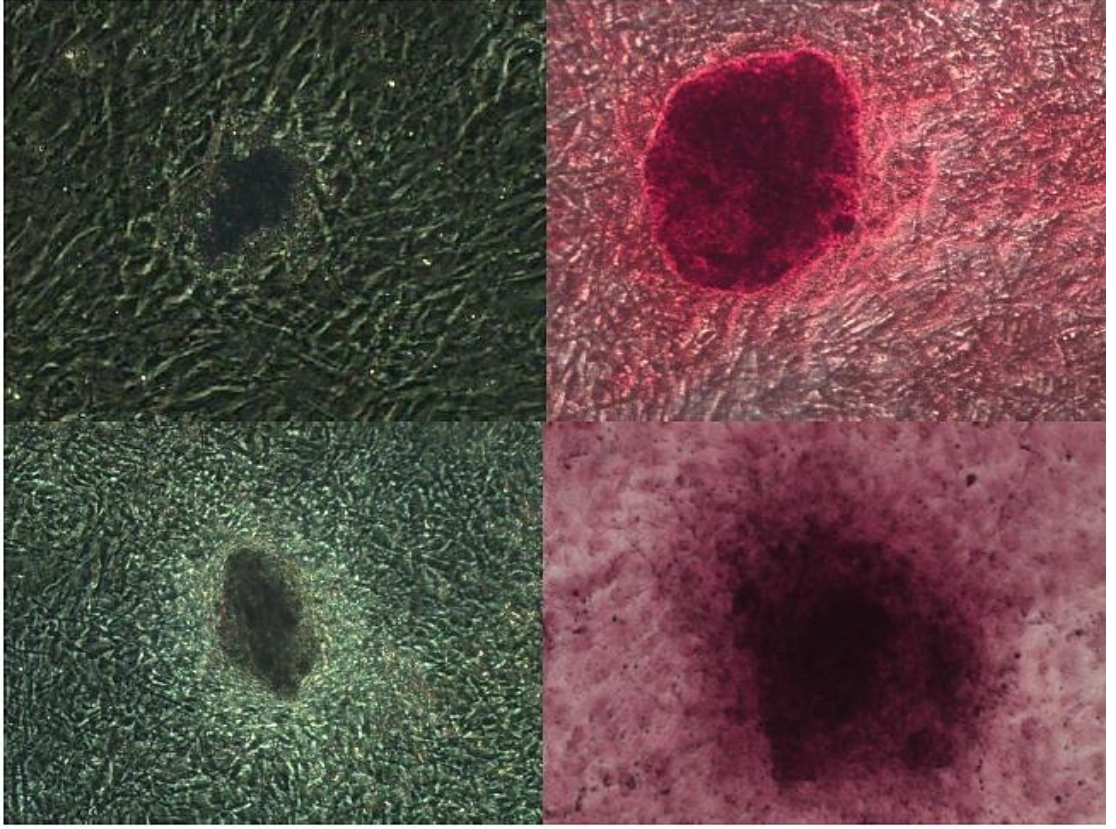
Çalışmamızda, hücrelerin MKH karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri analiz edilmiştir. Bu amaçla T25' lik flakslara ekilen ve çoğaltılan 2. pasajdaki hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları morfolojik olarak analiz edilmiştir.

Adipojenik farklılaşma besiyerinde hem sağlıklı hem de ALL'li bireylerin kemik iliği kaynaklı MKH'leri morfolojik olarak benzer şekilde yağ hücresine farklılaştığı görülmüştür. Ancak hasta ve sağlıklı bireyin adipojenik farklılaşma kapasitelerinde anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. (Sekil 4.1).



Sekil 4.1. Adipojenik farklılaşma deneyine ait mikroskop görüntüleri. Sağlıklı bireylerin yağ hücre morfolojisine sahip MKH'leri (4x) (a), Sağlıklı bireylerin MKH'lerinin Oil Red O boyası ile boyanmış yağ vezikülleri (4x) (b) ve ALL'li bireylerin yağ hücre morfolojisine sahip MKH'leri (c), ALL'li bireylerin MKH'lerinin Oil Red O boyası ile boyanmış yağ vezikülleri (4x) (d)

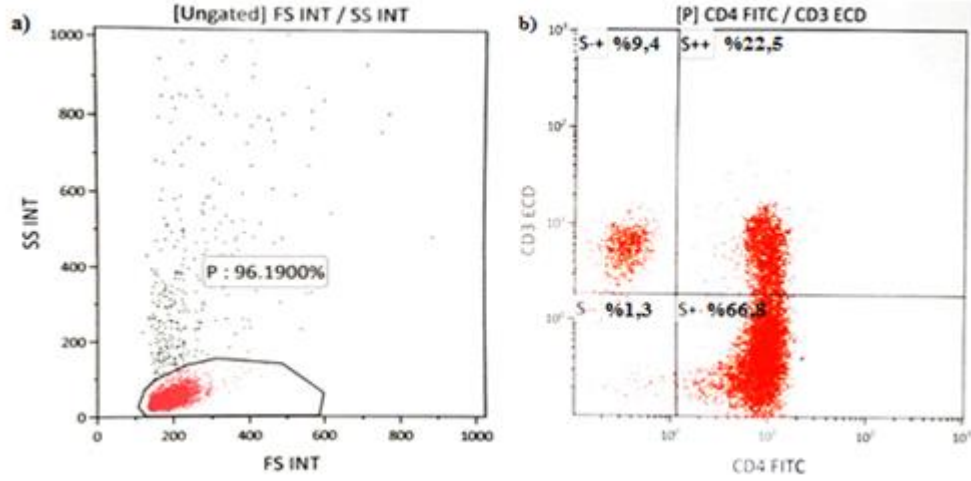
Kemik hücrelerine farklılaşması istenen hücreler T25'lik flaslara ekildikten ve flaskın yüzeyini tamamen kaplamaları sağlandıktan sonra osteojenik farklılaşma besiyeri eklenmiştir. Bu süreçte ayrıca osteojenik medyumla besiyeri değişimi de yapılmıştır. Yirmi beş gün sonunda morfolojik analiz elde etmek amacıyla kemik hücrelerine farklılaşması beklenen hücreleri içeren flasklar Alizarin Red boyası ile boyanmıştır. Boyamadan önce ve sonra inverted mikroskop görüntüleme sistemi ile fotoğrafları çekilerek farklılaşması beklenen hücreler gözlenmiştir. İki grup arasında osteojenik farklılaşma açısından fark saptanmamıştır. Mikroskop ile yapılan morfolojik gözlem sonucunda kemik hücrelerine farklılaşan hücreler (Şekil 4.2. a, c) ve kalsiyum birikintilerinin Alizarin Red boyası ile boyandığı gözlenmiştir (Şekil 4.2. b, d).



Şekil 4.2. Osteojenik farklılaşma deneyine ait mikroskop görüntüleri. Sağlıklı bireylerin kemik hücrelerine farklılaşmış MKH'leri (4x) (a), Sağlıklı bireylerin Kemik hücrelerine farklılaşmış MKH'lerinin Alizarin Red boyası ile boyanmış kalsiyum birikintileri (10x) (b) ALL'li bireylerin kemik hücrelerine farklılaşmış MKH'leri (4x) (c), ALL'li bireylerin kemik hücrelerine farklılaşmış MKH'lerinin Alizarin Red boyası ile boyanmış kalsiyum birikintileri (10x) (d)

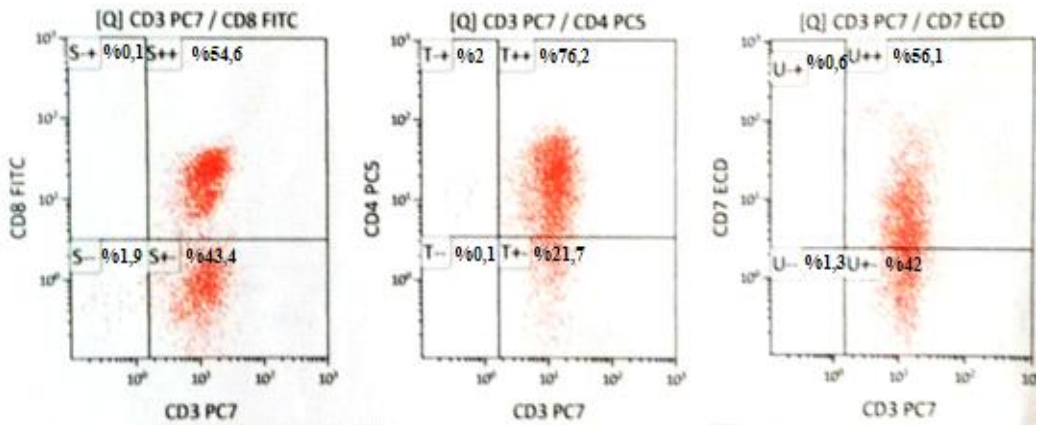
4.3. Blastik T Hücrelerin Flow Sitometri ile Analizi

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 2 T-ALL hastasının kemik iliği mononükleer hücrelerinden EasySep™ T Hücre izolasyon kiti ve magneti ile yapılan blastik T hücre izolasyonu sonrası elde edilen hücre popülasyonu FCM ile analiz edilmiştir. İlk olarak izolasyonun ne kadar verimli olduğunu ve hücre popülasyonunu belirlemek için analiz yapılmıştır. FS/SS grafiğindeki sonuca göre izole edilen hücre popülasyonlarının yaklaşık %97-94' ünü T hücreler oluşturmaktadır (Şekil 4.3.a). Bu hücrelerin ayrıca CD3, CD4, CD7 ve CD8 ekspresyonları (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) da incelenmiştir.



Şekil 4.3. Mononükleer hücrelerden izole edilen blastik T hücrelerin flow sitometrik analiz grafikleri.
 a) İzole edilen tüm hücrelerin FS/SS grafiğinde düştüğü alanın belirlenmesi ve T hücrelerin bulunduğu alanın kapılanması. b) Kapılan alan içerisinde yer alan T hücrelerin yüzey belirteçlerine göre ayrılması.

Totalde yaklaşık 10 000 hücre sayılarak yüzdece oranları belirlenmiştir. Grafiğe göre CD3 (-), CD4 (-) hücreler % 1,3; CD3 (+), CD4 (-) hücreler %9,4 ; CD3 (+), CD4 (+) hücreler %22,5; CD3 (-), CD4 (+) hücreler %66,8 oranındadır. %66,8 oranında CD3 (-), CD4 (+) olan hücreler T hücre gelişim basamaklarının daha immatür evrelerinde kalmış klonal çoğalma gösteren lenfoblastlardır. Ayrıca %9,4 oranında CD3 (+), CD4 (-) olan hücreler de artış gösteren bir başka klonal T hücre grubudur.



Şekil 4.4. T hücrelerin yüzey belirteçlerine göre FCM ile analizi.

T hücre olgunlaşma basamaklarının henüz başından itibaren eksprese olan antijen CD7'dir. Maturasyon devam ettikçe CD4, CD3 ve CD8 yüzey antijenleri de oluşur. Sonuçlarımıza göre elde ettiğimiz T hücrelerin yaklaşık %98'si CD3, CD4, CD7 ve CD8 antijenlerini eksprese etmektedir (Şekil 4.4).

4.4. Flow Sitometri ile Apoptoz Tayinine İlişkin Bulgular

Çalışmamız için ALL hastalarının ve sağlıklı bireylerin MKH'lerinin blastik hücrelerle kokültürü gerçekleştirilmiş olup hem sağlıklı bireyler hem de hastalar için araya membran koyarak ve membran koymadan (membransız) hücrelerin kokültürleri değerlendirilmiştir. Ayrıca kontrol olarak sadece MKH'ler ve sadece lenfositler kültüre edilmişlerdir. Kokültüre edilen grupların 96 saat sonundaki apoptozis oranları FCM ile analiz edilmiştir.

Karşılaştırmalar; hasta-sağlıklı, membranlı-membransız ve kontrol şeklinde yapılmıştır. Flow sitometrik analiz sonucu elde edilen yüzde oranları ayrıca istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Değerlendirmeler 3 faktör arasında 'Canlı Hücre Oranı (1. bölge)', 'Erken Apoptotik Hücre Oranı (2. Bölge)', 'Geç Apoptotik Hücre Oranı (3. Bölge)', ve 'Toplam Apoptotik Hücre Oranı (2.,3. Bölgeler toplamı)' açısından yapılmış olup şu şekildedir:

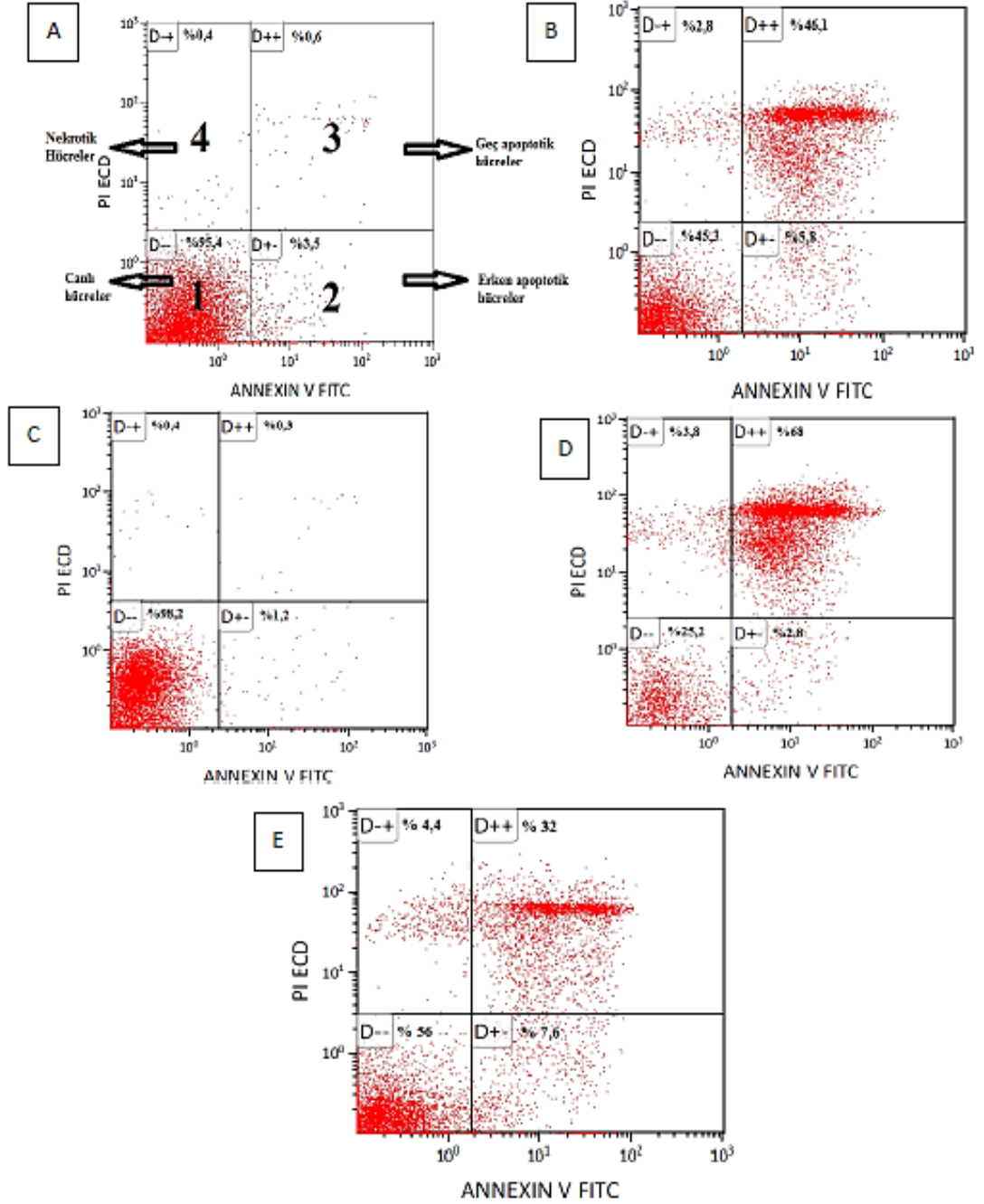
Faktör 1: Membranlı kokültür, Membransız kokültür ve Kontrol lenfositler arası karşılaştırma

Faktör 2: Hasta ve Sağlıklı bireyler arası karşılaştırma

Faktör 3: T-ALL ve B-ALL'li hastalar arası karşılaştırma

4.4.1. Hasta ve Sağlıklı Bireylerin Membranlı-Membransız Kokültürleri Sonrası Flow Sitometrik Analiz Bulguları

8 hasta (2 T-ALL, 6 B-ALL) ve 6 sağlıklı bireyin membranlı ve mebransız olarak kültüre edilen rnekleri FCM'de değerlendirilmiştir. Annexin V/PI ile yapılan apoptozis tayin yöntemi sonucu elde edilen grafikler canlı hücreler, erken apoptotik hücreler, geç apoptotik hücreler ve nekrotik hücrelerin yüzdelerini göstermektedir.



Şekil 4.5. Annexin V-FITC/PI apoptozis kiti ile ALL'li hastaların blastlarının apoptozis oranlarının flow sitometrik olarak belirlenmesi. A) T-ALL'li bir hastanın MKH'leri üzerine membran koyulmadan direk (hücre-hücre teması olacak şekilde) 1:1 oranında eklenen blastların apoptozis oranları. B) T-ALL'li bir hastanın MKH'leri üzerine membran koyularak (hücre hücre teması olmadan) 1:1 oranında eklenen blastların apoptozis oranları C) Sağlıklı bireyin MKH'lerinin aynı hastanın blastlarıyla 1:1 oranında membran koyulmadan kokültüre edilmesi sonucu blastların apoptozis oranı D) Sağlıklı bireyin MKH'lerinin aynı hastanın blastlarıyla 1:1 oranında membran koyularak kokültüre edilmesi sonucu blastların

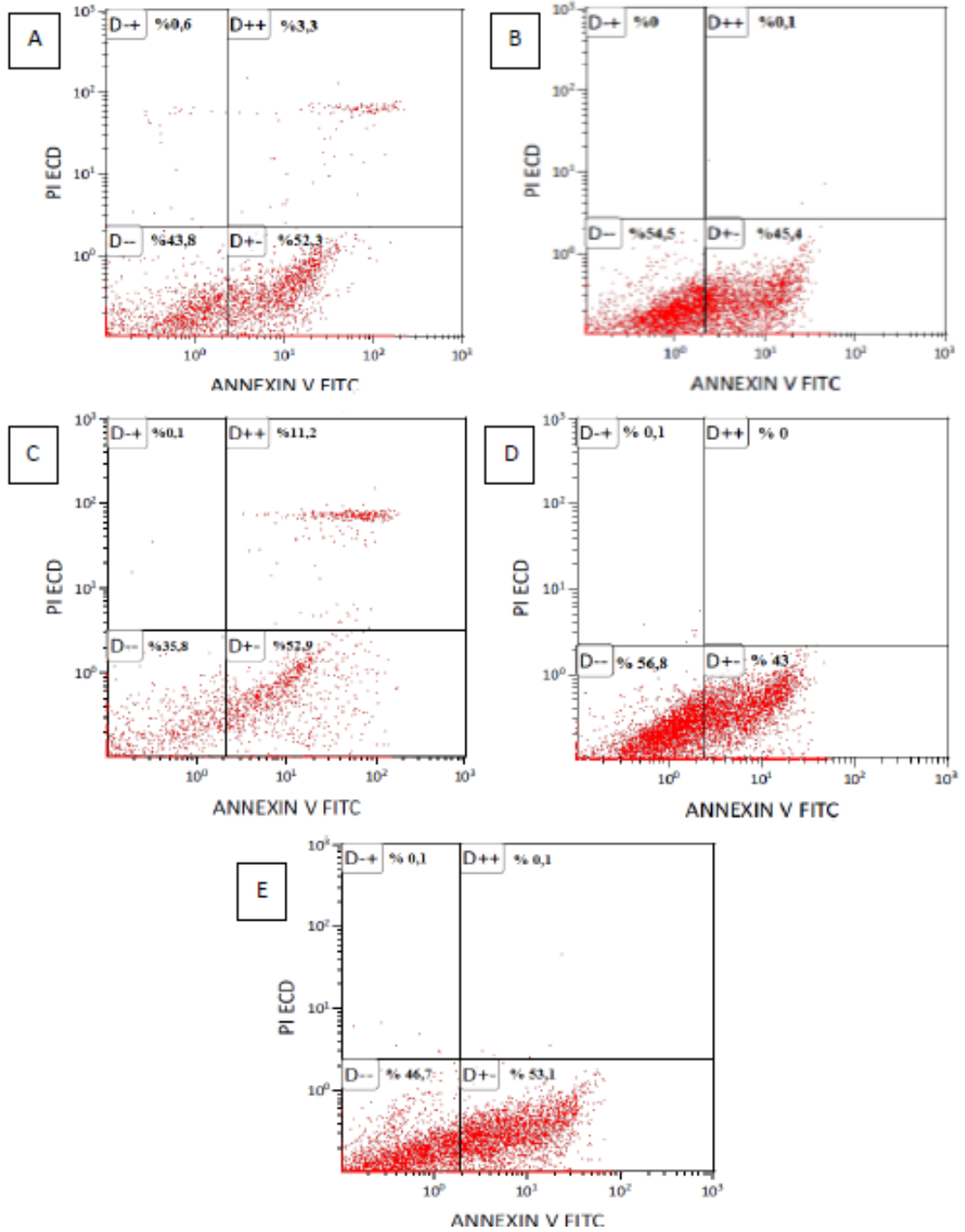
apoptozis oranı. E) T-ALL'li bir hastanın kontrol blastların apoptozis oranları

Şekil 4.5 ve 4.6' da görüldüğü gibi hasta ve sağlıklı bireylerin kokültürleri arasında önemli bir fark görülmemesine karşın membranlı ve membransız olarak kokültüre edilen örnekler arasında apoptozise gitmeleri açısından fark vardır.

Membransız olarak kültüre edilen blastik T hücrelerin apoptozise gitmediklerini çok yüksek oranda (% 95.4, % 98.2) canlı kaldıklarını, (Şekil 4.5. A, C) bunun yanısıra membranlı olarak MKH'lerle teması olmayan blastik hücrelerin daha çok apoptozise gittiğini (%51.9, % 70,8) söyleyebiliriz (Şekil 4.5. B, D) .

Hasta ve sağlıklı bireylerin MKH'lerinin blastik hücrelerin apoptozu açısından önemli bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Kontrol amacıyla ekilen blastların apoptozis oranlarında membran üzerindeki blastlarla yaklaşık olarak benzerdir. Ancak yine de kokültürde yer alan blastların apoptozis oranlarının daha fazla olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 4.5. E).

B-ALL'li hastalar için hem sağlıklı hasta bireyler arasında hem de membranlı membransız kokültürler arasında önemli bir fark görülmemiştir. Tüm hasta ve donörler için elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.6. Annexin V-FITC/PI (AV/PI) apoptoz kiti ile ALL'li hastaların blastlarının apoptozis oranlarının flow sitometrik olarak belirlenmesi. A) B-ALL'li bir hastanın MKH'leri üzerine membran koyulmadan direk (hücre-hücre teması olacak şekilde) 1:1 oranında eklenen blastların apoptozis oranları. B) B-ALL'li bir hastanın MKH'leri üzerine membran koyularak (hücre hücre teması olmadan) 1:1 oranında eklenen blastların apoptozis oranları C) Sağlıklı bireyin MKH'lerinin aynı hastanın blastlarıyla 1:1 oranında membran koyulmadan direk kokültüre edilmesi sonucu blastların apoptozis oranı D) Sağlıklı bireyin MKH'lerinin aynı hastanın blastlarıyla 1:1 oranında membran koyularak kokültüre edilmesi sonucu blastların apoptozis oranı. E) B-ALL'li bir hastanın kontrol blastların apoptozis

oranları

4.5. Flow Sitometri ile Apoptozis Tayini Sonucu Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizlerine İlişkin Bulgular

4.5.1. Faktör 1, 2 ve 3' de ki Değerlerin Geç Apoptotik Hücreler Oramı Açısından Karşılaştırılması

Faktör 1' e ait gruplarda geç apoptozis (3 numaralı bölge) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($\chi^2= 9.057$; $p=0.011$). İkili karşılaştırmalar sonucunda, yalnızca membransız ve membranlı kültürler arasında anlamlı düzeyde fark olduğu tespit edilmiştir ($p=0.008$). Membranlı grupta elde edilen apoptotik oranlar membransız grupta elde edilen değerlerden yüksektir (Tablo 4.2).

Benzer şekilde, belirlenen diğer faktörlerde (Faktör 2 ve Faktör 3) geç apoptotik hücre oranlarının karşılaştırılması sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir (sırasıyla, $z= 2.090$; $p=0.037$ ve $z= 3.322$; $p=0.001$).

Hastalar için belirlenen geç apoptotik hücre oranlarının ortancası 4.7 (min= 0.0; mak= 46.1) iken sağlıklı grup için ortanca değer 20.7 (min= 0.0; mak= 68.0)' dir. Faktör 3 için T ALL hasta grubunda elde edilen 3. bölge değerleri, B ALL hasta grubunda elde edilen değerlerden daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.2. Belirtilen faktörlerde geç apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar (M'sız: Membransız, M'lı: Membranlı).

	3. Bölge (geç apoptoz)				Test istatistiği	
	n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	χ^2 ; z	P
Faktör 1						
M sız*	29	0.1; 31.4	4.5	6.5±7.1	$\chi^2= 9.057$	0.011
M lı*	29	0.0; 68.0	31.5	27.6±21.2		
Lenfosit	11	0.0; 39.7	19.0	15.4±14.6		
Faktör 2						
Hasta	41	0.0; 46.1	4.7	12.2±14.4	z= 2.090	0.037
Sağlıklı	28	0.0; 68.0	20.7	23.5±21.3		
Faktör 3						
T ALL	32	0.1; 68.0	27.0	25.4±21.3	z= 3.322	0.001
B ALL	37	0.0; 33.4	4.1	9.3±10.7		

* $p=0.008$

Membransız olanlarda, hasta ve sağlıklılara ait geç apoptotik hücre oranları benzerdir ($z= 0.917$; $p=0.377$). T ALL için geç apoptotik hücre oranları ortancası 3.7 (min= 0.1; 10.1), B ALL için ise 6.1 (min= 1.6; mak= 31.4)' tür (Tablo 4.3). Membransız olanlarda Faktör 3 gruplarında sonuçlar benzerlik göstermektedir ($z= 1.943$; $p= 0.051$).

Membranlı olanlarda, hasta bireylerin geç apoptotik hücre oranları sağlıklı bireylerden daha düşük bulunmuştur ($z= 2.315$; $p=0.020$). Benzer şekilde, B ALL olanlar için elde edilen geç apoptotik hücre oranları T ALL için elde edilen geç apoptotik hücre oranlarından anlamlı düzeyde düşüktür ($z= 4.500$; $p<0.001$).

Lenfosit grubunda, T ALL ile B ALL geç apoptotik hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($z= 2.268$; $p=0.024$). Lenfosit olanlarda T ALL geç apoptotik hücre oranları 27.2 (min= 19.1; mak= 39.7), B ALL geç apoptotik hücrelerin ortancası 3.0 (min= 0.0; mak= 29.7)' dir.

Tablo 4.3. Faktör 1 gruplarında diğer faktörlerde geç apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar (M'sız: Membransız, M'lı: Membranlı).

Faktör 1		3. bölge				Test istatistiği	
		n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	z	P
M'sız	Faktör 2						
	Hasta	15	0.6; 9.7	3.4	4.3±3.0	0.917	0.377
	Sağlıklı	14	0.1; 31.4	6.5	8.9±9.4		
	Faktör 3						
	T ALL	14	0.1; 10.1	3.7	3.9±3.4	1.943	0.051
	B ALL	15	1.6; 31.4	6.1	9.0±8.8		
M'lı	Faktör 2						
	Hasta	15	0.0; 46.1	13.4	17.7±17.9	2.315	0.020
	Sağlıklı	14	0.0; 68.0	43.1	38.1±19.9		
	Faktör 3						
	T ALL	14	31.5; 68.0	45.5	46.0±9.5	4.500	<0.001
	B ALL	15	0.0; 33.4	4.1	10.3±12.6		
Lenfosit	Faktör 3						
	T ALL	4	19.1; 39.7	27.2	28.3±9.4	2.268	0.024
	B ALL	7	0.0; 29.7	3.0	8.0±11.7		

Membransız olup hasta olanlarda, T ALL ile B ALL sonuçları benzerdir ($z=0.915$, $p=0.412$). Membransız olup sağlıklı olanlarda ise T ALL için elde edilen geç apoptotik hücre oranları B ALL için elde edilen değerlerden anlamlı düzeyde düşüktür ($z=2.828$; $p=0.002$). Membranlı olup hasta olanlarda ve membranlı olup sağlıklı olanlarda faktör 3 grupları için elde edilen değerler farklıdır ($p<0.05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Faktör 1 ile Faktör 2 gruplarında Faktör 3 geç apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar (M' sız: Membransız, M'lı: Membranlı).

Faktör 1	Faktör 2		3. bölge				Test istatistiği	
			n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	z	P
M sız	Hasta	Faktör 3						
		T ALL	4	0.6; 6.5	3.3	3.4±3.2	0.915	0.412
		B ALL	11	1.6; 9.7	3.4	4.7±3.0		
	Sağlıklı	Faktör 3						
		T ALL	10	0.1;10.1	3.7	4.0±3.6	2.828	0.002
		B ALL	4	11.2; 31.4	20.7	21.0±8.3		
M lı	Hasta	Faktör 3						
		T ALL	4	31.5; 46.1	41.9	40.4±6.7	2.752	0.003
		B ALL	11	0.0; 33.4	4.1	9.5±12.5		
	Sağlıklı	Faktör 3						
		T ALL	10	32.0; 68.0	48.4	48.3±9.8	2.832	0.002
		B ALL	4	0.0; 26.0	12.2	12.6±14.5		

4.5.2. Faktör 1, 2 ve 3' deki Değerlerin Erken Apoptotik Hücreler Oranı Açısından Karşılaştırılması

Faktör 1 gruplarında erken apoptozis (2.bölge) oranları benzer iken diğer faktör gruplarında anlamlı fark olduğu görülmüştür (Tablo 4.5). Hasta bireylere ait erken apoptotik hücre oranları sağlıklı bireylere ait oranlardan yüksektir ($z= 4.192$; $p<0.001$).

Tablo 4.5. Belirtilen faktörlerde erken apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar (M' sız: Membransız, M'lı: Membranlı).

	2. bölge (erken apoptoz)				Test istatistiği	
	n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	χ^2 ; z	P
Faktör 1						
M sız	29	0.9; 64.1	30.8	29.7±22.5	$\chi^2= 2.347$	0.309
M lı	29	2.8; 88.9	34.2	35.5±23.2		
Lenfosit	11	6.7; 81.5	42.9	43.2±24.2		
Faktör 2						
Hasta	41	3.3; 88.9	43.3	43.8±22.4	z= 4.192	<0.001
Sağlıklı	28	0.9; 52.8	16.9	20.3±16.5		
Faktör 3						
T ALL	32	0.9; 64.1	8.3	16.3±16.1	z= 6.125	<0.001
B ALL	37	23.6; 88.9	45.4	49.9±16.0		

Membransız, Membranlı ve Lenfosit gruplarında hem faktör 2 hem de faktör 3 gruplarına ait değerler anlamlı düzeyde farklılık göstermektedir ($p<0.05$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Faktör 1 gruplarında diğer faktörlerde erken apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar. (M'sız: Membransız, M'lı: Membranlı)

Faktör 1		2. bölge				Test istatistiği	
		n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	z	P
M'sız	Faktör 2						
	Hasta	15	3.3; 64.1	43.1	40.5±19.9	2.619	0.008
	Sağlıklı	14	0.9; 52.8	7.8	18.1±19.7		
	Faktör 3						
	T all	14	0.9; 64.1	5.0	13.9±20.3	3.383	<0.001
	B all	15	23.6; 63.1	43.7	44.5±12.1		
M'lı	Faktör 2						
	Hasta	15	5.7; 88.9	45.4	47.6±24.4	2.924	0.003
	Sağlıklı	14	2.8; 43.0	23.9	22.5±13.0		
	Faktör 3						
	T ALL	14	2.8; 34.2	16.9	16.8±10.4	4.561	<0.001
	B ALL	15	34.2; 88.9	45.4	52.9±17.4		
Lenfosit	Faktör 3						
	T ALL	4	6.7; 42.9	20.7	22.7±18.3	2.273	0.024
	B ALL	7	35.8; 81.5	50.9	54.8±19.3		

Membransız olup hasta olanlarda T ALL ile B ALL sonuçlarının farklı olmadığı tespit edilmiştir ($z= 0.327$; $p=0.753$). Diğer durumlarda anlamlı fark belirlenmiştir ($p<0.05$; Tablo 4.7).

Membranlı olup hasta olanlarda T ALL grubunda belirlenen erken apoptotik hücre oranları B ALL grubunda belirlenen sonuçlardan anlamlı düzeyde düşüktür ($z= 2.810$; $p=0.001$).

Tablo 4.7. Faktör 1 ile Faktör 2 gruplarında Faktör 3 erken apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar (M' sız: Membransız, M' lı: Membranlı).

Faktör 1	Faktör 2		2. bölge				Test istatistiği	
			n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	z	P
M sız	Hasta	Faktör 3						
		T ALL	4	3.3; 64.1	29.0	31.4±32.5	0.327	0.753
		B ALL	11	23.6; 63.1	43.1	43.9±13.9		
	Sağlıklı	Faktör 3					2.828	0.002
		T ALL	10	0.9; 23.4	5.0	6.9±7.3		
		B ALL	4	39.1; 52.8	46.6	46.3±6.1		
M lı	Hasta	Faktör 3					2.810	0.001
		T ALL	4	5.7; 34.2	17.0	18.5±14.9		
		B ALL	11	34.2; 88.9	55.9	58.1±17.5		
	Sağlıklı	Faktör 3					2.828	0.002
		T ALL	10	2.8; 26.9	16.9	16.1±9.0		
		B ALL	4	34.7; 43.0	38.1	38.5±4.2		

4.5.3. Faktör 1, 2 ve 3' de ki Değerlerin Toplam Apoptotik Hücreler Oranı Açısından Karşılaştırılması

Hasta ve sağlıklı bireylerde toplam apoptotik hücrelerin (2. ve 3. bölgeler) oranları benzerdir ($z= 1.466$; $p=0.143$) (Tablo 4.8).

Faktör 1 gruplarında anlamlı fark oluşu tespit edilen toplam apoptotik hücreler oranı açısından membransız ve membranlı gruplarda farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.001$). Diğer ikili karşılaştırmalar sonucunda anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

T ALL grubunda toplam apoptotik hücre oranları B ALL grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşüktür ($z= 2.352$; $p=0.019$)

Tablo 4.8. Belirtilen faktörlerde toplam apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar (M' sız: Membransız, M'lı: Membranlı).

	2. ve 3. Bölge (toplam apoptoz)				Test istatistiği	
	n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	χ^2 ; z	P
Faktör 1						
M sız*	29	1.2; 70.5	40.5	36.2±25.6	$\chi^2=$ 16.966	<0.001
M lı*	29	38.3; 89.0	65.8	63.0±13.0		
Lenfosit	11	29.1; 85.3	53.2	58.5±19.5		
Faktör 2						
Hasta	41	3.9; 89.0	57.4	56.0±19.7	z= 1.466	0.143
Sağlıklı	28	1.2; 75.9	57.7	43.8±27.2		
Faktör 3						
T ALL	32	1.2; 82.6	51.4	41.6±27.9	z= 2.352	0.019
B ALL	37	27.0; 89.0	62.3	59.2±15.4		

* $p<0.001$

Membransız olanlarda T ALL ile B ALL sonuçları farklılık göstermektedir ($z= 3.491$, $p<0.001$). T ALL için toplam apoptotik hücre oranları ortancası 9.2 iken B ALL için bu değer 55.6' dır (Tablo 4.9). Membransız, membranlı ve lenfosit olanlarda Faktör 2 ve Faktör 3 gruplarında sonuçlar anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$).

Tablo 4.9. Faktör 1 gruplarında diğer faktörlerde toplam apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar (M' sız: Membransız, M'lı: Membranlı).

Faktör 1		2. ve 3. Bölge				Test istatistiği	
		n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	z	P
M sız	Faktör 2						
	Hasta	15	3.9; 69.9	52.0	44.8±20.5	1.571	0.123
	Sağlıklı	14	1.2; 70.5	13.6	27.0±27.9		
	Faktör 3						
	T ALL	14	1.2; 69.9	9.2	17.7±22.3	3.491	<0.001
	B ALL	15	27.0; 70.5	55.6	53.5±13.6		
M lı	Faktör 2						
	Hasta	15	38.3; 89.0	66.8	65.3±13.6	0.873	0.400
	Sağlıklı	14	39.7; 75.9	60.6	60.6±12.3		
	Faktör 3						
	T ALL	14	39.7; 75.9	64.7	62.8±10.6	0.175	0.880
	B ALL	15	38.3; 89.0	66.1	63.2±15.3		
Lenfosit	Faktör 3						
	T ALL	4	29.1; 82.6	46.2	51.0±23.2	1.134	0.315
	B ALL	7	37.7; 85.3	62.3	62.8±17.5		

Membransız olup sağlıklı olanlar için Faktör 3 gruplarına ait değerlerde anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($z= 2.828$; $p= 0.002$) (Tablo 4.10). Diğer durumlarda elde edilen değerler arasında farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Tablo 4.10. Faktör 1 ile Faktör 2 gruplarında Faktör 3 toplam apoptotik hücre oranlarına ait sonuçlar (M' sız: Membransız, M'lı: Membranlı).

Faktör 1	Faktör 2		2. ve 3. bölge				Test istatistiği	
			n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	z	P
M sız	Hasta	Faktör 3						
		T ALL	4	3.9; 69.9	32.6	34.8±35.6	0.261	0.851
		B ALL	11	27.0; 64.8	52.0	48.5±12.4		
	Sağlıklı	Faktör 3						
		T ALL	10	1.2; 33.5	9.2	10.9±10.6	2.828	0.002
		B ALL	4	64.0; 70.5	67.2	67.2±3.0		
M lı	Hasta	Faktör 3						
		T ALL	4	50.8; 66.8	58.8	58.8±8.6	1.568	0.138
		B ALL	11	38.3; 89.0	70.0	67.6±14.6		
	Sağlıklı	Faktör 3						
		T ALL	10	39.7; 75.9	65.8	64.4±11.2	1.697	0.106
		B ALL	4	41.0; 61.2	51.0	51.1±10.5		

4.5.4. Faktör 1, 2 ve 3' deki Değerlerin Canlı Hücreler Oranı Açısından Karşılaştırılması

Faktör 1 ile Faktör 3 gruplarında canlı hücre (1. Bölge) oranlarının anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği belirlenmiştir (sırasıyla $\chi^2 = 18.263$; $p < 0.001$ ve $z = 1.991$; $p = 0.046$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Belirtilen faktörlerde canlı hücre oranlarına ait sonuçlar (M' sız: Membransız, M'lı: Membranlı).

	1. Bölge (canlı hücreler)				Test istatistiği	
	n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	² ; z	P
Faktör 1						
M sız*	29	29.1; 98.5	56.0	62.2±25.2	² = 18.263	<0.001
M lı*	29	10.7; 61.7	31.9	34.6±13.4		
Lenfosit	11	14.2; 69.6	46.1	40.4±19.2		
Faktör 2						
Hasta	41	10.7; 95.7	41.3	42.6±19.6	z=1.332	0.183
Sağlıklı	28	19.0; 98.5	39.3	53.8±27.7		
Faktör 3						
T ALL	32	16.8; 98.5	45.7	55.8±25.8	z=1.991	0.046
B ALL	37	10.7; 71.5	35.8	39.7±15.3		

* $p < 0.001$

Membransız olanlarda hasta ve sağlıklı bireylerin canlı hücre oranları benzer iken T ALL grubunda elde edilen değerler B ALL grubu için elde edilen değerlerden anlamlı düzeyde yüksektir (sırasıyla, $z = 1.484$; $p = 0.146$ ve $z = 3.492$; $p < 0.001$) (Tablo 4.12).

Membranlı olanlar için hasta ve sağlıklı gruplarında canlı hücre oranları farklılık göstermemektedir ($z = 0.611$; $p = 0.561$). Benzer şekilde, T ALL ve B ALL için değerler arasında fark yoktur ($z = 0.218$; $p = 0.847$).

Tablo 4.12. Faktör 1 gruplarında diğer faktörlerde canlı hücre oranlarına ait sonuçlar

Faktör 1		1. Bölge				Test istatistiği	
		n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	z	P
M sız	Faktör 2						
	Hasta	15	29.2; 95.7	46.7	53.8±20.5	1.484	0.146
	Sağlıklı	14	29.1; 98.5	84.3	71.3±27.2		
	Faktör 3						
	T ALL	14	29.2; 98.5	87.9	80.5±22.1	3.492	<0.001
	B ALL	15	29.1; 71.5	43.9	45.2±12.9		
M lı	Faktör 2						
	Hasta	15	10.7; 61.7	30.9	33.1±13.4	0.611	0.561
	Sağlıklı	14	19.0; 59.0	35.9	36.2±13.6		
	Faktör 3						
	T ALL	14	19.0; 58.5	31.5	33.5±10.9	0.218	0.847
	B ALL	15	10.7; 61.7	32.1	35.7±15.6		
Lenfosit	Faktör 3						
	T ALL	4	16.8; 69.6	51.1	47.1±22.4	0.945	0.412
	B ALL	7	14.2; 62.3	36.5	36.6±17.8		

Membransız olup sağlıklı olanların T ALL grubunda canlı hücre oranlarına ait ortanca 87.9, B ALL grubunda canlı hücre oranları ortancası 32.0' dır ($z= 2.832$; $p=0.002$). Membransız olup hasta olanların, Membranlı olup hasta olanların ve sağlıklı olanların Faktör 3 gruplarında karşılaştırılmaları sonucunda gruplardaki farklılıklar anlamlı değildir ($p>0.05$, Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Faktör 1 ile Faktör 2 gruplarında Faktör 3 canlı hücre oranlarına ait sonuçlar.

Faktör1	Faktör2		1. Bölge				Test istatistiği	
			n	min; mak	Ortanca	Ort±SS	z	P
M sıız	Hasta	Faktör 3						
		T ALL	4	29.2; 95.7	66.7	64.6±35.9	0.261	0.851
		B ALL	11	34.4; 71.5	46.7	49.9±11.8		
	Sağlıklı	Faktör 3						
		T ALL	10	64.2; 98.5	87.9	86.9±10.9	2.832	0.002
		B ALL	4	29.1; 35.8	32.0	32.2±3.0		
M lı	Hasta	Faktör 3						
		T ALL	4	30.9; 45.2	38.0	38.0±7.7	1.306	0.226
		B ALL	11	10.7; 61.7	29.6	31.4±14.9		
	Sağlıklı	Faktör 3						
		T ALL	10	19.0; 58.5	29.9	31.6±11.8	1.982	0.054
		B ALL	4	35.5; 59.0	48.3	47.8±11.9		

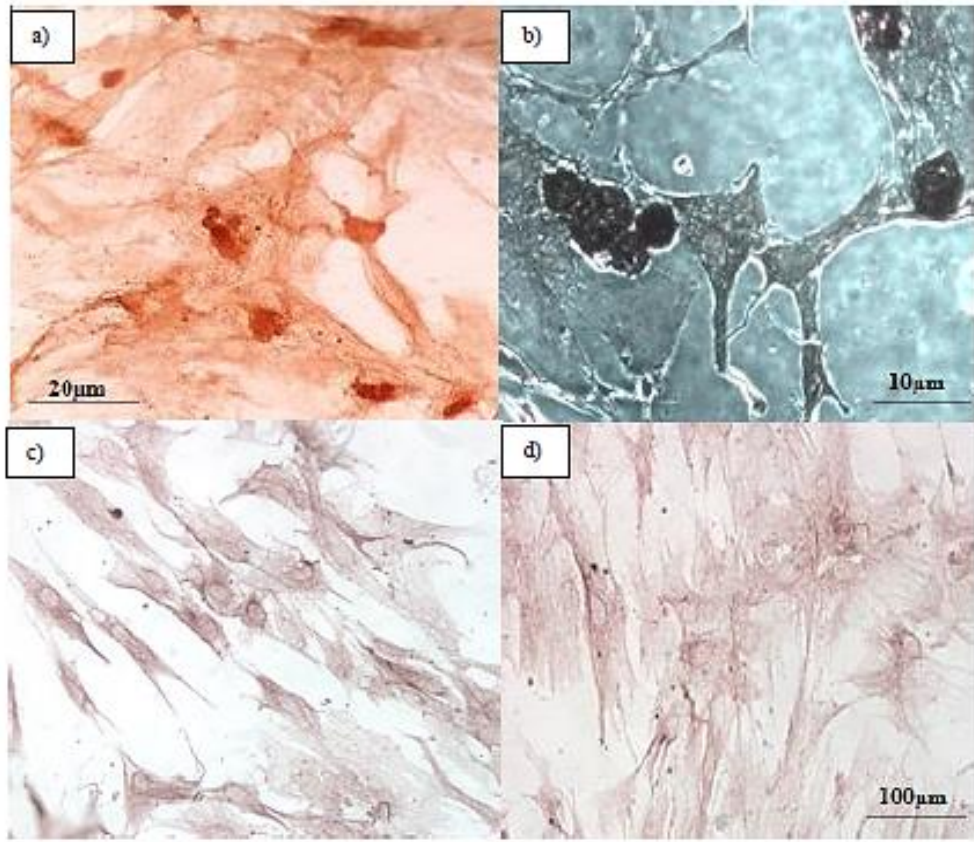
Membransız olanlarda hasta ve sağlıklı bireylerin canlı hücre oranları benzer iken T ALL grubunda elde edilen değerler B ALL grubu için elde edilen değerlerden anlamlı düzeyde yüksektir (sırasıyla, $z= 1.484$; $p= 0.146$ ve $z= 3.492$; $p<0.001$) (Tablo 4.12).

Membranlı olanlar için hasta ve sağlıklı gruplarında canlı hücre oranları farklılık göstermemektedir ($z=0.611$; $p=0.561$). Benzer şekilde, T ALL ve B ALL için değerler arasında fark yoktur ($z= 0.218$; $p=0.847$).

4.6. İmmünoSitokimya

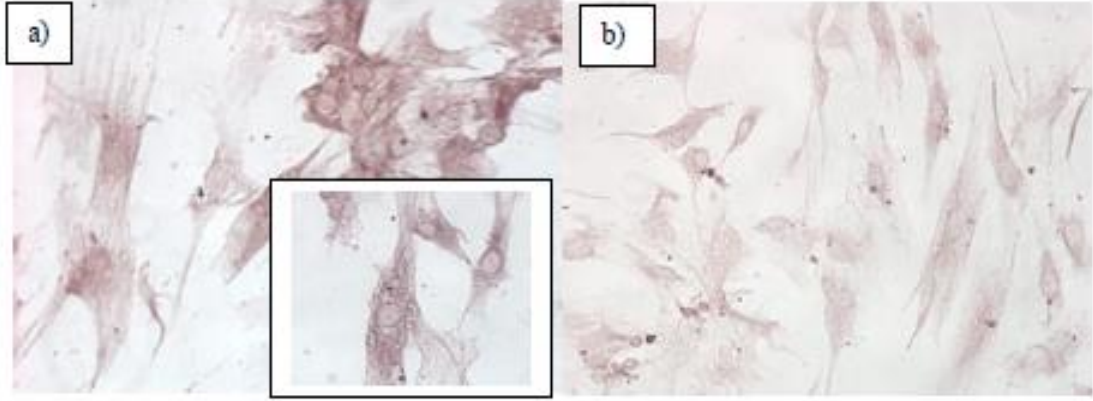
Membranlı ve membransız olarak kokültüre edilen MKH'ler β -katenin ekspresyonu açısından değerlendirilmiş olup hasta ve sağlıklı bireyler arasında fark

olduğu belirlenmiştir. Normalde sitoplazmada ya da hücre membranında bulunan, yolağın aktif olması durumunda nükleusa geçen β -katenin'in membransız olarak kokültüre edilen MKH'lerde nükleusa geçtiği grlmştir (şekil 4.7.a,b). Sadece hasta birey MKH'lerinde ekspresyon yeri açısından fark saptanmıştır. Membranlı kokltrlerde ise hem hasta hem de sağlıklı bireylerin MKH'lerinde β -katenin'in sitoplazmik ekspresyonu grlmştir. İmmun boyama DAB (,3'-diaminobenzidine) ile yapılmıştır. Nükleustaki ekspresyonun görülebilmesi için hematoksilen ile boyama yapılmamıştır.



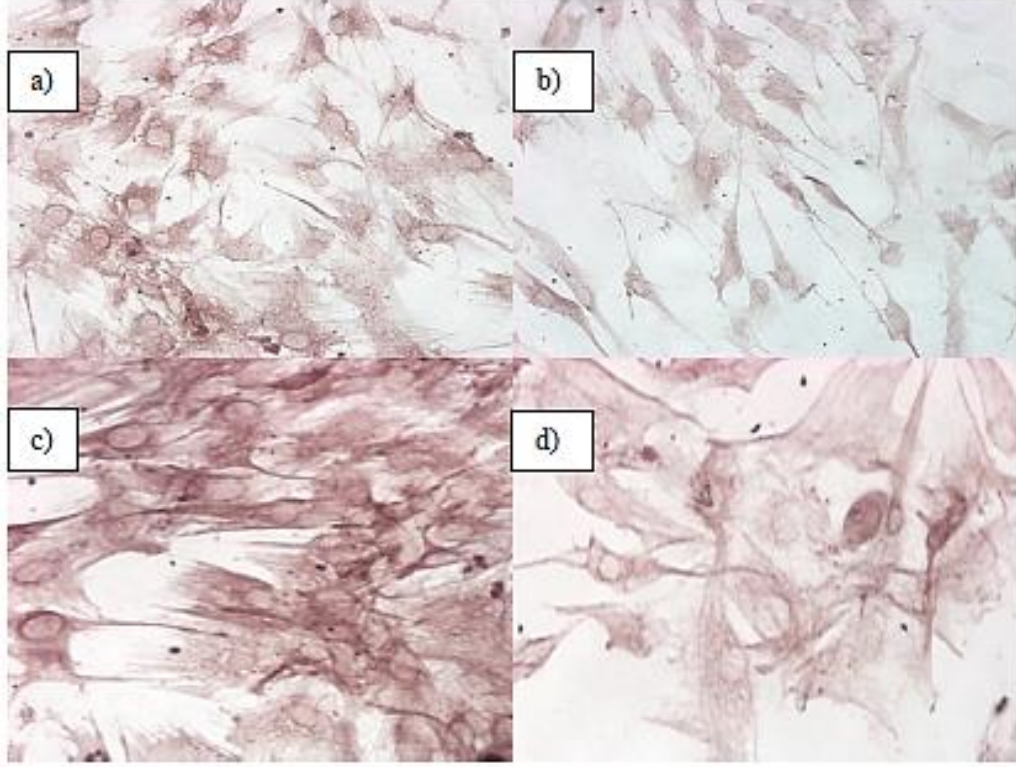
şekil 4.7. β -katenin immunositokimya alışmasınının DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojeni ile boyandıktan sonraki mikroskop görüntüleri. A) ALL'li bireyin membransız kokltrnde bulunan MKH'lerde β -katenin'in nükleusta ekspresyonu (Işık mikroskopu, 10x), B) Aynı rneğin invert mikroskopta görüntülenmesi 40x, C) ALL'li bireyin membranlı kokltrnde yer alan MKH'lerde β -katenin'in sitoplazmik ekspresyonu (invert mikroskop, 4x) D) Sağlıklı bireyin membransız kokltrnde bulunan MKH'lerde β -katenin'in sitoplazmik ekspresyonu (invert mikroskop, 4x)

Ayrıca eş zamanlı olarak MKH'lerde apoptozis gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek, apoptozisin WNT sinyal yolağıyla bağlantısı olup olmadığını anlamak amacıyla Bcl-2, Bax ve Kaspaz 3 proteinleri için de immunositokimya yapılmıştır. Membranlı ve membransız örnekler arasında bu proteinlerin ekspresyonları açısından farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Kantitatif olarak bir ölçüm yapılmamıştır.



Şekil 4.8. MKH'lerde Bax'ın immunositokimyasal olarak boyanmış görüntüleri (invert mikroskop 4x). a) Membranlı kokültüre olmuş MKH' ler b) Membransız kokültüre olmuş MKH'ler.

Bax ekspresyonunun genel olarak membranlı hücre gruplarında daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Wnt sinyal yolağının aktif olduğu membransız hücrelerin aksine apoptotik mekanizmalarda görev alan bu proteinlerin ekspresyonlarının hasta bireylerin membranlı hücre gruplarında daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı bireylerin membranlı-membransız kokültürlerindeki MKH'ler arasında bu proteinin ekspresyonu açısından önemli bir fark görülmemiştir.



Şekil 4.9. MKH'lerde Kaspaz 3 (a,b) ve Bcl-2'nin (c,d) immunositokimyasal olarak boyanmış görüntüleri (invert mikroskop 4x). a,c) Hasta bireyin membranlı kokültüre olmuş MKH'leri b,d) Hasta bireyin membransız kokültüre olmuş MKH'leri.

Apoptozisde antiapoptotik olarak görev alan proteinlerden biri olan Bcl-2'nin hasta örneklerinde daha yüksek oranda ekspresyon gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.9.c,d). Kaspaz 3 ekspresyonunun ise yine hasta örneklerinde daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9.a,b). Bax ile benzer şekilde hasta bireylerin membranlı örneklerinde ekspresyonun daha fazla olduğu kantitatif olarak belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalarla kanserin ilerleme sürecinde tümör mikroçevresinin oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır. Kemik iliği mikroçevresi, hematopoez için birçok sitokin, kemokin ve büyüme faktörünün salgılandığı dinamik bir mikroçevredir. Böyle bir mikroçevre, kanser hücresinin oraya yerleşmesi ve sağkalımı için uygun bölge olmasına izin verir. Kanser hücresinin stromal mikroçevreyle etkileşimi sonucu stromal hücrelerin fizyolojik bariyer fonksiyonları hasar göerek kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik özellikler kazanmasına sebep olur. Birçok solid kanserde sıklıkla kemik iliği metastazı görmemizde bu durumu destekler niteliktedir.

Lösemide kemik iliğindeki hücre sayısı ve içeriği değiştiğinden mikroçevreye salınan sitokinler ve büyüme faktörleri de değişir. Ancak henüz bu değişimin nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Mikroçevredeki değişimler sonucu mu akut lösemi meydana gelir yoksa başka bir değişim mi lösemiye neden olur hala yanıtlanmayı bekleyen sorulardır (6).

Lösemi gibi kemik iliği mikroçevresinin bozulduğu hastalıklarda mikroçevrede yer alan stromal hücreler ve blastların etkileşimleri blastların sağkalımına ve tedaviye dirençli hale gelmelerine sebep olabilmektedir. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin apoptozisi engelleyerek blastların sağkalımını artırdığı düşünülmektedir (120). Ancak bu etkiyi hücre hücre teması kurarak mı yoksa farklı büyüme faktörleri ve sitokinlerle mi gösterdikleri tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca mikroçevrede etkili olan çeşitli sinyal yollarında stromal hücreler aracılığıyla blastların sağkalımına etkisi olduğu düşünülmektedir (121).

Tez çalışmamız kapsamında çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemili hastaların ve sağlıklı vericilerin MKH'lerinin blastik hücrelerin sağkalımı üzerindeki etkilerini kokültür çalışmalarıyla araştırdık. Bu nedenle akut lenfoblastik lösemili hastalarımızın yeni tanı anında alınmış kemik iliği örneklerinden blastları ayırdı. Blastlar, hastaların ve sağlıklı vericilerin MKH'leriyle kokültüre ederek MKH'lerin

blastlar üzerindeki apoptotik etkileri incelendi. Ayrıca MKH'lerin blastların sağkalımında Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerinden bir etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla β -katenin, Bcl-2, Bax ve Kaspaz 3 ile immunositokimya çalışmaları gerçekleştirildi.

Çalışmamızda ilk olarak kemik iliğı örnekleri alınan çocukluk çağı ALL hastalarının ve sağlıklı vericilerinin mononükleer hücre izolasyonu yapılarak izole edilen hücreler kültüre edildi. Mononükleer hücrelerden MKH'lere geçiş için hücreler pasaj 2'ye getirildi. Pasaj 2'de ki hücrelerin MKH'ler olduğunu kanıtlamak için morfolojik görüntüleri, osteoblastik ve adipojenik dönüşümleri incelendi. Hem hasta hem de sağlıklı bireylerin MKH'leri arasında adipojenik ve osteojenik farklılaşma açısından bir fark görülmedi.

Kokültür için T-ALL'li ve B-ALL'li hastalardan blastlar izole edildi. Tanı anı kemik iliğı örnekleri olduğu için yapılan flow sitometrik analizler sonucunda blast oranları yüksek (%70-96) bulundu. Lösemilerde tanı anında lösemik blast sayısı oldukça yüksektir (122).

İzole edilen blastlar MKH'lerle kokültüre edildi. MKH'lerin blastik hücrelerle 96 saatlik kokültürünün ardından membran üzerinde bulunan blastik hücreler ve membransız kokültüre edilen blastik hücreler toplandı ve flow sitometri ile apoptotik analiz yapıldı. Annexin V/PI ile yapılan flow sitometrik analiz sonuçlarına göre membranlı ve membransız kültüre edilen hücre grupları arasında apoptoza gitme açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü. Membransız kokültüre edilen hücrelerin apoptoza gitmediğı daha çok canlı kaldığı belirlendi. Toplam apoptotik hücre oranları incelendiğinde kontrol ve B-ALL'li hücre grubuyla kıyaslanan, membransız kültüre edilmiş T-ALL'li hasta grubu hücrelerinin apoptoza gitme oranı oldukça düşük bulundu. Kontrol grubuyla kıyaslandığında B-ALL'li hastaların membransız kokültürlerindeki hücrelerin apoptoz oranı da düşük bulundu, ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca sağlıklı MKH'lerle membransız kokültüre edilen T-ALL'li hastaların blastlarının apoptoz oranı aynı şekilde kültüre edilen B-ALL'li hastaların blastlarının apoptoz oranından düşük bulundu. Özellikle membransız kültür gruplarında

apoptozun düşük bulunması MKH'lerin hücre hücre teması ile blastların apoptozunda etkili olduğunu düşündürmüştür. Literatürdeki birçok çalışma sonucumuzu destekler niteliktedir. Yapılan çalışmalarda T-ALL'li blastların sağkalımında hücre hücre temasının önemli olduğunu ve bunu blastların yüzeyindeki lökosit fonksiyon-ilişkili antijen 1(LFA-1)' in stromal hücrelerdeki hücreiçi adezyon molekülü (ICAM-1) ile bağlanması sonucu yaptığını göstermişlerdir (83, 123, 124). Tartışmalı olarak başka bir çalışmada ise T-ALL blastlarının sağkalımında interlökinlerin anahtar rol oynadığı öne sürülmüştür (125). Ancak sonuçlarımız da gösteriyor ki hücre teması olmayan, membranlı olarak kültüre edilen blastların sağkalımında tek başına sitokinler etkili değildir. Bu durum kemik iliği mikroçevresinin blastların sağkalımında kompleks ve dinamik ağlar kullandığını ve stromal hücrelerle blastların etkileşimlerinin önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Geç apoptotik hücreler açısından yine membranlı ve membransız gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi. Membransız gruptaki blastik hücrelerde sağkalım daha fazla iken membranlı gruptaki blastlar daha çok apoptoza gitmiştir. Ayrıca apoptoza gitme süreci açısından T-ALL'li ve B-ALL'li hastaların blastik hücreleri arasında da anlamlı fark vardı. Aynı süreçte apoptoza giden hücreler arasında T-ALL'li hastaların blastik hücrelerinin çoğu geç apoptoz evresinde iken B-ALL'li hastaların blastlarının erken apoptoz evresinde olduğu saptandı.

Flow sitometriyle apoptoz çalışmalarının ardından hasta ve sağlıklı bireylerin MKH'lerin de Wnt/ β -katenin sinyal yolağının anahtar molekülü olan β -katenin'nin hücre içindeki ekspresyon seviyeleri belirlendi. Wnt sinyal yolağının kanser dahil birçok hastalıkta bozulduğu gösterilmiştir (126, 127). Kolorektal kanserler gibi solid kanserlerde iyice aydınlatılmış olan yolağın hematolojik hastalıklardaki rolü hala keşfedilmeyi beklemektedir. Özellikle ALL hücrelerinde Wnt yolağının MKH'ler tarafından aktive edildiği ve bu yolağın aktivasyonunun blastların apoptozunda etkili olduğu düşünülmektedir. MKH'lerin çeşitli Wnt ligandlarını eksprese ederek Wnt sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (9). Çalışmamız kapsamında hasta ve sağlıklı bireylerden alınan MKH'lerde β -katenin ekspresyonu açısından fark olduğu saptanmıştır. Sitoplazmada bulunan, sinyal yokluğunda parçalanan β -katenin sinyal varlığında ise nukleusa geçerek transkripsiyonu başlatır. Sağlıklı vericilerin

MKH'lerinde sitoplazmik ekspresyon gösteren β -katenin hasta bireylerde nuklear ekspresyon gösterdi. Nuklear ekspresyon gösteren hasta gruplarında bu yolağın aktive olduğu tespit edildi. Wnt sinyal yolağında görevli olan Frizzled proteininde yapılan knockout çalışmaları sonrasında anormal B hücre gelişiminin saptandığı yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (128). Hasta bireyler arasında da membransız olarak kültüre edilen MKH'lerde nuklear ekspresyonun membranlı olarak kültüre edilen hasta MKH'lerinden daha fazla olduğu görüldü. Membransız hücre gruplarında Wnt/ β -katenin sinyal yolağının daha fazla aktive olması, blastların sağkalımının membransız hücre gruplarında daha yüksek olması MKH'lerin blastların apoptozunda Wnt/ β -katenin sinyal yolağını kullanımını doğrular niteliktedir.

MKH'lerde β -katenin ekspresyonu ile birlikte apoptotik proteinlerden Bcl-2, Bax ve Kaspaz 3'ün ekspresyonları immunositikimyasal yöntemle belirlendi. Literatüre bakıldığında genellikle blastik hücrelerin sağkalımı ya da apoptozu incelenmiş ancak lösemide hem Wnt/ β -katenin sinyal yolağının çalışıldığı hem de MKH'lerin apoptozuna bakıldığı çalışmalara oldukça az rastlanmıştır. Bu konudaki bilgiler oldukça sınırlı olmakla birlikte çalışmamız sonucunda membranlı ve membransız olarak kokültüre edilen MKH'lerde bu proteinlerin ekspresyonu açısından farklar olduğu saptandı. Üç proteinin ekspresyonunun özellikle membranlı olarak kokültüre edilen MKH'lerde daha fazla olduğu görüldü. Yapılan bir çalışmada hipoksik ortamda MKH'lerde Bax ve Bcl-2'nin ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (129). Başka bir çalışmada ise Wnt sinyal yolağının apoptozu engellediği bulunmuştur (130). Karşıt olarak triple negatif meme kanserli hastalarda yapılan çalışmada Wnt sinyal yolağının proliferasyonu ve farklılaşmayı inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir (131). Membransız kültüre edilen MKH'lerde aktive olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağının MKH'lerin apoptozu gitmelerini önlemiş olabileceği, yolağın aktive olmadığı membranlı hücre gruplarında ise apoptozu önemli bir etkisi olmadığından hücrelerin daha fazla apoptozu gittikleri düşünülebilir. Bax, Bcl-2 ve Kaspaz ekspresyonlarının değişmesi mitokondri aracılı (intrinsik) apoptoz yolağının etkili olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda; akut lenfoblastik lösemili hastaların ve sağlıklı bireylerin MKH'lerinin, blastlarla kokültüre edildiğinde, hücre-hücre temasının lösemik hücrelerin sağkalım oranlarını artırdığı ve apoptoz oranlarını düşürdüğü ortaya konmuştur. Bu etkileşimde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aracılı mekanizmaların etkili olabileceği yönünde pozitif bulgular elde edilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında aşağıda sıralanan sonuçlara varılmıştır:

- ✓ Kemik iliği örneklerinden plastik yüzeye yapışabilen stromal hücreler geliştirildi ve *in vitro* da çoğaltıldı. Çoğaltılan hücrelerin morfolojik özellikleri ve farklılaşma potansiyelleri incelendi. Hücrelerin iğsi ve adeziv yapıda olduğu, *in vitro* ortam koşullarında adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyeli taşıdıkları gösterildi. Bu hücrelerin MKH' ler olduğu kanıtlandı.
- ✓ Flow sitometride apoptozis tayini için yapılan analizler sonucunda blastik hücrelerin apoptotik oranları ve canlı kalma oranları belirlendi. Belirlenen bu değerler istatistiksel olarak analiz edildi ve istatistiksel açıdan anlamlı farklar bulundu.
- ✓ Apoptozise giden toplam hücre oranları değerlendirildiğinde; membransız ve membranlı gruplar arasında farklılık olduğu saptandı. Membransız grupların daha az oranda apoptozise gittiği blastik hücrelerin çoğunun canlı kaldığı belirlendi.
- ✓ Hasta ve sağlıklı bireylerde apoptoza giden toplam hücre değerlerinin benzer olduğu dolayısıyla MKH'lerin blastlarla etkileşimi açısından, MKH'nin hasta ya da sağlıklı bireyden olması arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı.
- ✓ T ALL'li hastaların membransız kültürlerinde elde edilen toplam apoptotik hücre oranları B ALL' i hastalara göre anlamlı düzeyde daha düşük bulundu.

- ✓ Kokültüre edilen MKH'lerde β -katenin protein ekspresyonunun olup olmadığını görmek için yapılan immunositokimya çalışmaları sonucunda hasta bireyler ve sağlıklı bireylerde proteinin ekspresyonu açısından fark bulundu.
- ✓ Hasta bireylerin MKH'leri nukleusta β -katenin ekspresyonu gösterirken sağlıklı bireylerin MKH'lerinin sitoplazmada ekspresyon gösterdiği belirlendi. Kantitatif olarak yapılan değerlendirmelerde nükleer ekspresyonun membransız hasta MKH'lerinde daha fazla olduğu gözlemlendi.
- ✓ Antiapoptotik proteinlerden Bcl-2 ekspresyonu için membranlı ve membransız gruplar arasında fark olduğu membranlı ve hasta bireyden alınan MKH'lerin daha yüksek ekspresyon gösterdiği belirlendi.
- ✓ Kaspaz 3 ve Bax ekspresyonlarının, membranlı olarak kokültüre edilen hasta MKH'lerinde daha fazla, membransız gruplarda ise daha az olduğu saptanmıştır.
- ✓ Elde ettiğimiz bu sonuçlar; MKH'lerin hücre-hücre kontağı kurarak ALL' de artan blastik hücrelerin apoptozisini engelleyici etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu etkilerini de hasta bireylerin membransız olarak kokültüre edilen MKH'lerinde aktive olan Wnt sinyal yolağıyla gerçekleştirdiği düşünülebilir. Böylece blastik hücrelerin mikroçevre kaynaklı desteğini bozmak için Wnt sinyal yolağının hedeflenmesi potansiyel bir terapötik strateji olarak değerlendirilebilir. Fakat *in vitro* da yapılan deneylerin genişletilerek *in vivo* deneylerle desteklenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Uzunhan TA, Karakaş Z. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. *Çocuk Dergisi*. 2012;12(1):6-15.
2. Figuera LE, Borjas-Gutierrez C, R Garcia Gonzalez. Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia-From the Molecules to the Clinicognition*. 2013: 43-73.
3. Lanzkowsky P. Leukemias. In: Arlene R. (ed). *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, Fifth Edition, Elsevier; 2011: 518-549.
4. Yang Y, Mallampati S, Sun B, Zhang J, Kim S, Lee J-S, et al. Wnt pathway contributes to the protection by bone marrow stromal cells of acute lymphoblastic leukemia cells and is a potential therapeutic target. *Cancer Lett*. 2013;333(1):1-20.
5. Lakshminpathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev*. 2005;19(1):29-38.
6. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Nature* 2009;23(12):2233-41.
7. Testa U. TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies. *J Cell Biochem*.

2010;110(1):21-34.

8. Wickremasinghe RG, Hoffbrand a V. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*. 1999;93(11):3587-600.
9. Yang Y, Mallampati S, Sun B, Zhang J, Kim SB, Lee JS, et al. Wnt pathway contributes to the protection by bone marrow stromal cells of acute lymphoblastic leukemia cells and is a potential therapeutic target. *Cancer Lett* ; 2013;333(1):9-17.
10. Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003;129(4):199-221.
11. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):843-50.
12. Staal FJT, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(1):21-30.
13. Cao H, Oteiza A, Nilsson SK. Understanding the role of the microenvironment during definitive hemopoietic development. *Experimental Hematology* 2013;41(9):761-8.
14. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
15. Kierszenbaum AL. Blood and Hematopoiesis. In: Kierszenbaum AL (ed). *Histology and Cell Biology-An Introduction to Pathology*, Third Edition, Elsevier, 2012: 179-200.
16. Durand C, Dzierzak E. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica*. 2005;90(1):100-108.

17. Sigvardsson M. New light on the biology and developmental potential of haematopoietic stem cells and progenitor cells. *Journal of Internal Medicine*. 2009;266(4):311-24.
18. Kaushansky K. Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. 2006;354(19):2034-45.
19. King KY, Goodell M a. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nat Rev Immunol*; 2011;11(10):685-92.
20. Yan M, Wang Y, Yang M, Liu Y, Qu B, Ye Z, et al. The effects and mechanisms of clinorotation on proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015; 460(2):327-32.
21. Margolin, JF Steube, CP Poplack D. Principles and practice of pediatric oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:539-580.
22. Barnard DR et al. Morphologic, immunologic and cytogenetic classification of ALL in childhood. 1996;250(10):5-12.
23. Mutlu N. BFM - 2000 Protokolü Almış Akut Lenfoblastik Lösemili Çocuklarda Miyeloid İşaretliyi Pozitifliğinin Prognostik Değeri Ve Diğer Prognostik Faktörler İle İlişkisi. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Bakırköy Doğumevi Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2005.
24. Pui C-H., Acute lymphoblastic leukemia.In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K PJ (editors), *Williams Hematology* 7th Edition. 2006:254-5.

25. Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2009;23(4):655-74.
26. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):1-24.
27. Soycan, YL. Akut lenfoblastik lösemi. İçinde: *Tanı Klinik*. Pediatrik Hematoloji. 1.Basım. İstanbul Medikal Yayıncılık; 2011:595-640.
28. Wang D, Zhu H, Liu Y, Yin R, Zhao L, Zhang Z, et al. Multi-Role of Cancer Stem Cell in Children Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Arangure JMM, editor. *Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia - From the Molecules to the Clinic*. 2013:75-86.
29. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. The development and survival of lymphocytes. 2001;257-320.
30. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012;201(2):389-96.
31. Hutter JJ. Childhood Leukemia. *Pediatrics in Review*. 2010;13(2):234-241.
32. Kim E-J, Kim N, Cho S-G. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Mol. Med*. Nature Publishing Group; 2013;45(1):1-10.
33. Ramdasi S, Sarang S, Viswanathan C. Potential of Mesenchymal Stem Cell based application in Cancer. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 2015;9(2):95-103.

34. Mcculloch EA, Till JE. Commentary perspectives on the properties of stem cells. *Nature Medicine*, 2005;11(10):1026-8.
35. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287(5457):1442-6.
36. Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish J Hematol*. 2008;25(2):57-9.
37. Thomson J a, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz M a, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
38. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006;441(7097):1068-74.
39. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
40. Rastegar F, Shenaq D, Huang J, Zhang W, Zhang B-Q, He B-C, et al. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells*. 2010;2(4):67-80.
41. Dexter TM, Spooncer E, Schofield R, Lord BI, Simmons P. Haemopoietic stem cells and the problem of self-renewal. *Blood Cells*. 1984;10(2-3):315-39.
42. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000;164(2):247-56.

43. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
44. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2014;21(2):216-25.
45. Conforti A, Biagini S, Del Bufalo F, Sirleto P, Angioni A, Starc N, et al. Biological, functional and genetic characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from pediatric patients affected by acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2013;8(11).
46. Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(5):321-34.
47. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439-41.
48. Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX, Zhang Y, Tang PH, et al. Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation. *Cell Res*. 2005;15(7):539-47.
49. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
50. Pittenger MF, Mackay a M, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.

51. Ullah I, Baregundi Subbarao R, Rho G-J. Human Mesenchymal Stem Cells - Current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015; doi:10.1042/BSR20150025.
52. Wang S, Qu X, Zhao R. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol.* BioMed Central Ltd; 2012;5(1):19.
53. Yuan Y, Chen D, Chen X, Shao H, Huang S. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation but maintain survival of Jurkat leukemia cells in vitro by activating Notch signaling. *Journal of Southern Medical University*, 2014;34(4):441–7.
54. Becker A De, Riet I Van. Mesenchymal stromal cell therapy in hematology : from laboratory to clinic and back again. *Stem Cells and Development*, 2015;1–49.
55. Chan J, O'Donoghue K, de la Fuente J, Roberts IA, Kumar S, Morgan JE, et al. Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Stem Cells* 2005;23:93–102.
56. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):93–106.
57. Castro-Manreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *J Immunol Res*; 2015,doi:10.1155/2015/394917.
58. Patel AN, Genovese J. Potential clinical applications of adult human mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Cloning Adv Appl.* 2011;4(1):61-72.
59. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002;30(1):42-8.

60. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(4):487-500.
61. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:457-78.
62. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005;105(5):2214-9.
63. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107:367-372.
64. Shi M, Liu Z-W, Wang F-S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(1):1-8.
65. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008;111(3):1327-33.
66. Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120-6.
67. Park MJ, Park HS, Cho M La, Oh HJ, Cho YG, Min SY, et al. Transforming growth factor-transduced mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Treg/Th17 cells and osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(6):1668-80.

68. Nicola M Di, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43.
69. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141-50.
70. Nasef A, Ashammakhi N, Fouillard L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. *Regen Med*. 2008;3(4):531-46.
71. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103(12):4619-21.
72. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003;101(9):3722-9.
73. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
74. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2006;6(2):386-98.

75. Lazennec G, Jorgensen C. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells*. 2008;26(6):1387-94.
76. Momin EN, Vela G, Zaidi HA, Quiñones-Hinojosa A. The Oncogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Cancer: Directions for Future Research. *Curr Immunol Rev*. 2010;6(2):137-48.
77. Martinez-Agosto JA, Mikkola HKA, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev*. 2007;21(23):3044-60.
78. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(5):1195-201.
79. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006;31(10):589-95.
80. Shiozawa Y, Havens a M, Pienta KJ, Taichman RS. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia*. 2008;22(5):941-50.
81. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501(7467):346-54.
82. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental Cell*. 2010;18(6):884-901.
83. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia*. 2009;29(6):997–1003.

84. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins D a. Leukemic Cells Create Bone Marrow Niches That Disrupt the Behavior of Normal Hematopoietic Progenitor Cells. *Science* 2008;322(12):1861-5.
85. Tavor S, Petit I. Can inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis eradicate acute leukemia? *Seminars in Cancer Biology*. 2010;20(3):178-85.
86. Konopleva MY, Jordan CT. Leukemia stem cells and microenvironment: Biology and therapeutic targeting. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):591-9.
87. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*. 2005;258(6):479-517.
88. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie a H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol*. 1995;6(1):3-16.
89. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*. 2006;11(4):506–25.
90. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yeppez S, Livingston EH. Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research*. 2007;139(1):143–56.
91. Haytoğlu Z. Çocukluk Çağı Akut Lösemilerinde Apoptotik Yolakta Trail ve Trail Ligand. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı. Uzmanlık Tezi, Adana: Çukurova Üni.; 2011.

92. Balakumaran A, Campbell GA, Moslen MT. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;139(1):122-7.
93. Vatansever S, Şimsek F. Apoptotik ve Otofajik Ölümlerde Hücre İçi Organizasyon. *Yeni Tıp Dergisi* 2014;31:6-11.
94. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(6):401-10.
95. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2011;351(1):41-58.
96. Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function.* 2011;6(29):468-80.
97. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
98. Hung RWY, Chow AW. Dissecting the “end game”: Clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assessment of apoptosis. *Clinical and Investigative Medicine.* 2004;27(6):324-44.
99. Ashkenazi a, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281(5381):1305-8.
100. Sendoel A, Hengartner MO. Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology* 2014;29(3):168-76.
101. Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD.* 2004;1(1):59-70.

102. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2001;2(1):91-95.
103. Günnur D, Yanıkkaya Demirel G., Akan Hücre Ölçer. 1. Baskı. Yelken Ajans Reklamcılık, Yayıncılık ve Matbaacılık; 2014. 145-151.
104. García M a, Carrasco E, Ramírez A, Jiménez G, López-ruiz E, Perán M, et al. Apoptosis as a Therapeutic Target in Cancer and Cancer Stem Cells: Novel Strategies and Futures Perspectives. *Intech*. 2012; .doi:10.5772/48267.
105. Wickremasinghe RG, Hoffbrand A V. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*. 1999;93(11):3587-3600.
106. Hongmei Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review Scientist. *Apoptosis Med*. 2012;3-22.
107. Nusse R. WNT targets: Repression and activation. *Trends in Genetics*. 1999;15(1):1-3.
108. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*. 2005;15(1):28-32.
109. Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *Journal of Pathology*. 2005.205(2):130-44.
110. Prunier C, Hocevar BA, Howe PH. Wnt signaling: physiology and pathology. *Growth Factors*. 2004;22(8):141-50.
111. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004;303(5663):1483-7.

112. Kimelman D, Xu W. Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*. 2006;25(57):7482-91.
113. Novak A, Dedhar S. Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci*. 1999;56(5-6):523-37.
114. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68-75.
115. Willert K, Jones K a. Wnt signaling: Is the party in the nucleus? *Genes Dev*. 2006;20:1394-404.
116. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*. 2002;3(1):3001.
117. Moll MM. Neoplastic Hematopathology. *Am J Surg Pathol*. 2010;17(8):531-44.
118. Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2006;34(11):1604-5.
119. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
120. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey a Y, Afanasiev B V, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 2002;16(9):1713-24.
121. Wu S, Korte A, Kebelmann-Betzing C, Gessner R, Henze G, Seeger K. Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression. *Leuk Res*. 2005;29(1):63-72.

122. Rodríguez-Pardo VM, Aristizabal J a, Jaimes D, Quijano SM, de los Reyes I, Herrera MV, et al. Mesenchymal stem cells promote leukaemic cells aberrant phenotype from B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2013;6(3-4):89-100.
123. Winter SS, Sweatman JJ, Lawrence MB, Rhoades TH, Hart AL, Larson RS. Enhanced T-lineage acute lymphoblastic leukaemia cell survival on bone marrow stroma requires involvement of LFA-1 and ICAM-1. *Br J Haematol.* 2001;115(4):862-71.
124. Damiano JS, Cress a E, Hazlehurst L a, Shtil a a, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood.* 1999;93(5):1658-67.
125. Scupoli MT, Donadelli M, Cioffi F, Rossi M, Perbellini O, Malpeli G, et al. Bone marrow stromal cells and the upregulation of interleukin-8 production in human T-cell acute lymphoblastic leukemia through the CXCL12/CXCR4 axis and the NF-kappaB and JNK/AP-1 pathways. *Haematologica.* 2008;93(4):524-32.
126. You A, Fokas E, Wang LF, He H, Kleb B, Niederacher D, et al. Expression of the Wnt antagonist DKK3 is frequently suppressed in sporadic epithelial ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(4):621-7.
127. Huang CL, Liu D, Ishikawa S, Nakashima T, Nakashima N, Yokomise H, et al. Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2008;44(17):2680-8.
128. Seke Etet PF, Vecchio L, Nwabo Kamdje AH. Interactions between bone marrow stromal microenvironment and B-chronic lymphocytic

leukemia cells: Any role for Notch, Wnt and Hh signaling pathways?
Cellular Signalling. 2012;24(7):143-43.

129. Chen T-L, Zhu G-L, Wang J-A, Wang Y, He X-L, Jiang J. Apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells caused by hypoxia/reoxygenation via multiple pathways. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(12):4686-97.
130. Chen S, Guttridge DC, You Z, Zhang Z, Fribley A, Mayo MW, et al. Wnt-1 Signaling Inhibits Apoptosis by Activating β -Catenin / T Cell Factor-mediated Transcription. *Nature Cell Research* 2001;152(1):87-96.
131. Bilir B, Kucuk O, Moreno CS. Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Journal of Translational Medicine*; 2013;11(1):280.

8. EKLER

EK-1. Etik Kurul İzni

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sağlıklı Kişilerin ve T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemili Hastaların Kemik İliklerinden Elde Edilen Mezenkimal Stromal Hücrelerin Lösemik Blastlar Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2014-063

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	İrfan Baştuğ Cad. Ziraat Mah. Kurtdereli Sok. No:10 Dışkapı/Altındağ - ANKARA
	TELEFON	312 596 98 59
	FAKS	312 347 23 30
	E-POSTA	diskapi.cocuk.eah@gmail.com

BAŞYURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Habibe Meltem ÖZGÜNER			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji Uzmanı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
		Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Fatma DEMİREL
İmza:



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sağlıklı Kişilerin ve T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemili Hastaların Kemik İliklerinden Elde Edilen Mezenkimal Stromal Hücrelerin Lösemik Blastlar Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2014-063

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	13.10.2014	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	13.10.2014	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	13.10.2014	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014-063	Tarih: 13.10.2014				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmann/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmann/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.					

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Fatma DEMİREL

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Fatma DEMİREL	Çocuk Endokrinoloji	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Namuk Yaşar OZBEK	Çocuk Hematoloji ve Onkoloji	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Can Naci KOCABAŞ	Çocuk Alerji ve İmmünoloji	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yavuz SANİSOĞLU	Biyostatistik	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Meltem ÖZGÜNER	Histoloji ve Embriyoloji	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sina EMİR	Çocuk Onkoloji	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Cahide YILMAZ	Çocuk Nöroloji	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sinan CANAN	Fizyoloji	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. H. Tugrul TIRYAKI	Çocuk Cerrahi	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Fatma DEMİREL

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sağlıklı Kişilerin ve T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemili Hastaların Kemik İliklerinden Elde Edilen Mezenkimal Stromal Hücrelerin Lösemik Blastlar Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2014-063

Doç. Dr. Kemal SAYAR	Farmakoloji	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	X. Sayar
Doç. Dr. Emine DİBEK MISIRLIOĞLU	Çocuk Alerji	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Nida DİNÇEL	Çocuk Nefroloji	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av. Süleyman BOŞÇA	Avukat	Ankara Barosu	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Müd. Yrd. Talip KESKİN	Sağlık Kurumları İşletmeciliği	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Fatma DEMİREL
İmza:



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

EK-2. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Tuba ÖZDEMİR
Doğum Tarihi	: 12/04/1989
Doğum Yeri	: Erzurum
Medeni Hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tel	: 03123241555
e-mail	: tozdemir@ybu.edu.tr
EĞİTİM	
Lise	: Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesi, ERZURUM
Lisans	: İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İSTANBUL Universitat Ulm, Department of Biology, Ulm, GERMANY
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: 68 (YDS)
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği	

EK-3. Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. Ozdemir T, Ozguner HM. Sağlıklı kişilerin ve T Hücreli Akut LEnfoblastik Lösemili Hastaların Kemik İliklerinden Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Lösemik Blastlar Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Çalıştayı, 10-12 Eylül 2014, Manisa, Türkiye

2. Ozdemir T, Ozguner HM, Koksall Y. Comparison of Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow of Patients with Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Healthy Donors on Leukemic Blasts. Gordon Research Seminar: Stem Cell & Cancer, 14-20 Şubat 2015, Ventura, California, ABD.